

Integración temporal de las señales fotoperiódicas

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Juan Ignacio Cagnola

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires - 2008

Instituto de investigaciones fisiológicas y ecológicas vinculadas a la agricultura
(IFEVA)



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Jorge José Casal

Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires
PhD, Universidad de Leicester, Inglaterra

Consejero de Estudios

Marcelo Javier Yanovsky

Licenciado en Ciencias Biológicas, FCEyN, Universidad de Buenos Aires
Doctor en Biología, FCEyN, Universidad de Buenos Aires

DEDICATORIA

Mi modo de agradecer es dedicando esta tesis fruto de mi esfuerzo, mi curiosidad, mi vocación y por sobre todo mis compañías.

A mi director Jorge Casal por su paciencia, su perseverancia y su magnífica conducción inspiradora. A mi amiga Romina Sellaró, por su infinita generosidad. Al laboratorio grande y sus habitantes, por su amabilidad y encanto. Al IFEVA, por que en sus pasillos encontré siempre una solución a mis problemas. A la Facultad de Agronomía, por regalarme tantos sueños.

A los que amo, por ser la razón de todo lo hago.

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución

Ing. Agr. Juan Ignacio Cagnola.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Sánchez, S.⁽¹⁾, Cagnola, J.I.⁽¹⁾, Crepy, M.⁽¹⁾, Yanovsky, M.J. y Casal, J.J.

2010. Balancing forces in the photoperiodic control of flowering. Photochemical and photobiological sciences. Vol. 10, 451-460.

⁽¹⁾ Estos autores contribuyeron de igual modo en el trabajo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	Pág.IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Pág.X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	Pág.XIV
RESUMEN.....	Pág.XX
ABSTRACT.....	Pág.XXI

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

A. Las plantas, el ambiente y la floración.....	Pág.1
B. Control de la floración por el fotoperíodo.....	Pág.2
C. EL reloj circadiano de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Pág.6
D. Mecanismos de percepción del fotoperíodo: Modelo <i>GI-CO-FT</i>	Pág.10
D.1. <i>FT</i> , el florigen.....	Pág.10
D.2. El rol de <i>GIGANTEA</i>	Pág.14
E. Otros controles de la floración.....	Pág.16
F. Objetivos y justificación.....	Pág.20
G. Material Vegetal ¿Porqué usamos <i>Arabidopsis thaliana</i> ?	Pág.21

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Pág.23
B. Tratamientos fotoperiódicos.....	Pág.24
C. Medición del tiempo a floración.....	Pág.25
D. Extracción de ARN y análisis de expresión global de genes mediante microarreglos.....	Pág.25

E. Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (q-PCR).....	Pág.26
F. Bioensayos con <i>Botrytis cinera</i>	Pág.27
G. Cuantificación de la tasa de aborto en silicuas de <i>Arabidopsis</i>	Pág.27

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE I)

EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DEL TIEMPO A FLORACIÓN

A. Dinámica de la transcripción de genes a floración: Balance de Fuerzas.....	Pág.29
B. Respuesta fisiológica de floración a fotoperíodos inductores.....	Pág.32
C. Respuesta transcripcional de los genes de floración a fotoperíodos inductores.....	Pág.34
D. La vía autónoma condiciona a la respuesta fotoperiódica.....	Pág.42

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE II)

EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DE LA DEFENSA DE LAS

PLANTAS

A. Otros procesos regulados por el fotoperíodo: La señalización del ácido jasmónico.....	Pág.47
B. Vías de interacción entre el fotoperíodo y JA a través de expresión de genes.....	Pág.51
C. El fotoperíodo como regulador de la resistencia de las plantas al ataque de hongos patógenos.....	Pág.55

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE III)**EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DEL PROCESO DE ABORTO**

A. Regulación de la expresión génica de las proteínas con Arabinogalactanos (AGPs)	Pág.61
B. Localización y función de los AGPs en óvulos de maíz.....	Pág.65
C. Regulación del aborto por el fotoperíodo, el rol de <i>FLA9</i>	Pág.67

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES

A. Conclusión general.....	Pág.71
B. Conclusiones parciales.....	Pág.71
B.1. El fotoperíodo como regulador del tiempo a floración.....	Pág.71
B.2. El fotoperíodo como regulador de la defensa de las plantas.....	Pág.73
B.3. El fotoperíodo como regulador del proceso de aborto de semillas.....	Pág.73
BIBLIOGRAFÍA.....	Pág.75
APÉNDICES.....	Pág.103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.I: Coeficiente de correlación (r), coeficiente de regresión (R^2) y valor-p asociado entre la expresión genética y el tiempo a floración para diferentes genes vinculados al proceso de floración. Se muestran solamente los genes significativos ($p < 0.05$), en la Tabla S.1 del APÉNDICE se encuentra la lista completa.....	Pág.38
Tabla 4.I: Funciones sobre-representadas por los genes que componen cada cluster, con su valor p correspondiente. El análisis se realizó con la plataforma ATCOECIS. Esta es una tabla resumen, la información completa se encuentra en la Tabla S.2 del APÉNDICE.....	Pág.49
Tabla S.1: Coeficiente de correlación (r), coeficiente de regresión (R^2) y valor-p asociado entre la expresión genética y el tiempo a floración para diferentes genes vinculados al proceso de floración según TAIR (diciembre 2009).....	Pág.107
Tabla S.2: Funciones sobre-representadas por los genes que componen cada cluster, con su valor p correspondiente. El análisis se realizó con la plataforma ATCOECIS.....	Pág.108
Tabla S.3: Lista de genes de <i>Arabidopsis</i> regulados por el ácido jasmónico. Se señala la dirección del efecto: valores positivos promueve y valores negativos inhiben. (Goda et al., 2008).....	Pág.115
Tabla S.4: Genes de <i>Arabidopsis</i> involucrados en la señalización del ácido jasmónico según ATCOECIS.....	Pág.127

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Modelos fisiológicos de percepción fotoperiódica. **a-**“*Modelo Hourglass*”. **b-** “*Modelo externo de coincidencia*”. Los esquemas de la izquierda corresponden a los días largos, los de la derecha corresponden a días cortos. Los modelos están esquematizados para plantas de día largo (PDL). Adaptado de Yanovsky y Kay, Nature Reviews, 2007.....**Pág.4**
- Figura 1.2:** Modelo de una respuesta circadiana en condiciones de entrenamiento (ciclos de luz-oscuridad) en función del tiempo (horas). Se aprecian la amplitud (la mitad de la distancia entre el máximo y mínimo), el período (distancia entre máximos o mínimos y la fase (hora de ocurrencia del valor máximo). Adaptado de Harmer 2009.....**Pág.7**
- Figura 1.3:** Mecanismo simplificado del funcionamiento del reloj circadiano. Los *Inputs* (Luz y temperatura), el oscilador central (los principales genes actúan en él, *LHY/CCA1* y *TOC1*) y los *Outputs* (procesos controlados por el reloj). Adaptado de Harmer 2009.....**Pág.8**
- Figura 1.4:** Patrones de expresión de ARNm de los genes *CO* y *FT* controlados por relojes circadianos y niveles de proteína de CO para días cortos (**a**) y días largos (**b**). Adaptado de Andrés y Coupland, Nature, 2012.....**Pág.11**
- Figura 1.5:** Esquema de vías a floración. La vía fotoperiódica está ubicada hacia la derecha de la hoja; la vía autónoma, la vía de la vernalización⁽¹⁾ y la vía de las temperaturas ambientales están ubicadas a la izquierda de la hoja. La vía de la edad y la vía de las giberelinas actúan directamente en el ápice. Los rebordes cuadrados indican transcriptos (ARN) y los redondos proteínas. FT y SOC1 integran las señales que provienen de todas las vías de floración. Adaptado de Fornara et al., 2010.....**Pág.13**

Figura 3.1: Ordenamiento de genes según tipo de respuesta a los días largos (Inhibición o Inducción de la expresión) y efecto sobre la floración (promoción o represión). Los gráficos muestran la expresión de los genes en función de las horas del día para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) o días largos (símbolos blancos). El gris tenue denota los momentos de la noche en los días cortos, el gris oscuro son los momentos de noche para ambos grupos de plantas. Todos los genes presentan diferencias estadísticas en su expresión con un $p < 0.05$**Pág.30**

Figura 3.2: Respuesta fisiológica del tiempo a floración en función del número de ciclos inductores para plantas creciendo en días cortos. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos de plantas. Las flechas negras en el gráfico y estrellas negras en el esquema indican los días en los que se cosechó muestra vegetal para extracción de ARN. Para todos los casos correspondía a las 16 h de comenzado el día, excepto la primer muestra en común entre ambos tratamientos que fue tomada a las 8 h del día.....**Pág.33**

Figura 3.3: Correlación entre el cociente de expresión génica en plantas creciendo siempre en días largos o días cortos (DL/DC) y el cociente de expresión génica en plantas transferidas de días cortos al número indicado de ciclos inductores: **a-** 1 , **b-** 2, **c-** 4 y **d-** 6. Los puntos corresponden a 65 genes relacionados a floración según TAIR. Se destacan a los genes *FT* y *GI*. La línea 1:1 se incluye como referencia. La expresión corresponde a la hora 16 desde el comienzo del día.....**Pág.36**

Figura 3.4: **a-** y **b-**; Expresión genética de *GI* y *FT* para plantas creciendo en días cortos y plantas inducidas. Las flechas negras indican el número de ciclo al que corresponde el punto. Tiempo a floración en función de los ciclos inductores en plantas WT y mutantes **c-gi** y **d-ft**.....**Pág.39**

Figura 3.5: Patrones diarios de expresión genética de *GI* medidos por q-PCR para plantas WT creciendo en DC (**a-** y **b-**). **c-** Expresión genética en función de las horas del día para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) o días largos (símbolos blancos).....**Pág.40**

Figura 3.6: Tiempo a floración medido en número de hojas en función del número de ciclos inductores (días largos) para los mutantes **a-*flc***, **b-*tfll***, **c-*syp*** y **d-*pcfs4***. Todos los mutantes son comparados al WT (genotipo salvaje). En cada gráfico se muestra los valores p obtenidos luego del análisis estadístico para el número de ciclos, el genotipo y la interacción del N° de ciclos con el genotipo.....**Pág.43**

Figura 4.1: Clusters de expresión genética en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros). Los clusters se construyeron con ayuda del programa D-Chip utilizando los 7096 genes seleccionados después del ANOVA. Entre paréntesis figura el número de genes que componen cada cluster.....**Pág.48**

Figura 4.2: Patrón general de expresión de **a-** genes promovidos por JA (318 genes) y **b-** genes inhibidos por JA (149 genes) en función del tiempo desde comienzo de los tratamientos para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) y plantas inducidas con días largos (símbolos blancos).....**Pág.51**

Figura 4.3: Expresión de los genes involucrados en la señalización mediada por ácido jasmónico (ATCOECIS) en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros).....**Pág.52**

Figura 4.4: Daño ocasionado en las hojas por *Botrytis cinerea* (Área infectada) para plantas creciendo en DC y después de la inoculación siguieron en DC (barras negras) o pasaron a DL (barras blancas) para diferentes genotipos:**a-** WT (control), *phyA-cry1-cry2* y *myc2*; **b-** WT (control), *cop1.4* y *cop1.6* . El área infectada se midió transcurridas

48h desde la inoculación. Distintas letras indican diferencias significativas (LSD de Fisher, nivel de significancia=0,05).....**Pág.57**

Figura 5.1: Expresión de los genes AGP y subfamilia FLA en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros).....**Pág.62**

Figura 5.2: Tiempo a floración medido en número de hojas en función del número de ciclos inductores (días largos) para los mutantes *a-fla9.1*, *b-fla9.2*. Todos los mutantes son comparados al WT (genotipo salvaje). En cada gráfico se muestra los valores p obtenidos luego del análisis estadístico para el número de ciclos, el genotipo y la interacción del N° de ciclos con el genotipo.....**Pág.63**

Figura 5.3: Correlación entre granos abortados y expresión genética de AGPs y subfamilia FLAs en espigas de maíz a 4 DDP. Las plantas corresponden a dos cultivares NK880 y NK900 pertenecientes a Syngenta, sembrados en densidades alta (10 pl m⁻²) y baja (6 pl m⁻²), sometidos a sequías tempranas o tardías. Se detalla el nombre del gen en maíz, el nombre del gen homólogo en *Arabidopsis*, el coeficiente de regresión y su correspondiente valor p.....**Pág.64**

Figura 5.4: **a-** Óvulo fecundado de maíz a 4 DDP teñido con los reactivos de Yariv para visualizar la localización de AGPs en los tejidos. **b-** Metodología utilizada para la aplicación de los reactivos de Yariv sobre las flores femeninas de maíz a 4 DDP. **c-** Granos abortados en espigas tratadas con β -glucosyl y β -Mannosyl para dos cultivares AX886 y AX852. El cuadrante muestra el aborto natural de espigas no tratadas (Control) y el aborto en espigas manipuladas a las que se le agregó agua destilada (Agua). * significa $p > 0.05$**Pág.66**

Figura 5.5: Tasa de aborto de plantas de genotipo WT y *fla9-1* creciendo en días cortos y días largos. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p > 0.05$)..... **Pág.68**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%: Porcentaje

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µmol: Micromol

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Copia de ácido desoxirribonucleico

AGP: Proteínas arabinogalactanos

AP1: Gen *APETALA 1*

AP2: Gen *APETALA 2*

APX: Gen *ASCORBATE PEROXIDASE*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Mensajero de ácido ribonucleico

ATH1: Gen *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX GENE 1*

CAB: Gen *CHLOROPHYLL a/b BINDING PROTEIN*

CCA1: Gen *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*

CCA1: Proteína de *CCA1*

CDF1: Gen *CYCLING DOF FACTOR*

CDF1: Proteína del gen *CYCLING DOF FACTOR*

cm: Centímetro

CO: Gen *CONSTANS*

co: Planta mutante nula del gen *CO*

CO: Proteína de *CO*

COI1: Proteína del gen *CORONATIVE-INSENSITIVE1*

Col0: Columbia 0

COP1: Gen *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1*

cop1: Planta mutante nula del gen *COP1*

COP1: Proteína de *COP1*

COP1-OX: Planta sobreexpresante del gen *COP1*

Cry: Criptocromo

d: Días

DC: Día corto

DDP: Días después de la polinización

DL: Día largo

ELF3: Gen *EARLY FLOWERING 3*

ELF4: Gen *EARLY FLOWERING 4*

ERF2: Gen *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2*

FKF1: Gen *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1*

FLA: “*Fasciclin-like Arabinogalactan-protein*”

FLC: Gen *FLOWERING LOCUS C*

FLC: Gen *FLOWERING LOCUS C*

FRI: Gen *FRÍGIDA*

FRY: Gen *SAL1/FIERY1*

FT: Gen *FLOWERING LOCUS T*

ft: Planta mutante nula del gen *FT*

FT: Proteína de *FT*

FUL: Gen *FRUITFUL*

FZL: Gen *FZO-LIKE*

g: Gramo

GA: Hormona giberelina

GI: Gen *GIGANTEA*

gi: Planta mutante nula del gen *GI*

GI: Proteína de *GI*

h: Horas

Hd1: Gen *Heading date 1*

JA: Hormona ácido jasmónico

JÁ-Ile: Jasmonoyl-iso-leucine

JAR1: Gen *JASMONATE RESISTANCE 1*

jar1: Planta mutante nula del gen *FT*

JAR1: Proteína de *JAR1*

JAR1: Proteína de *JAR1*

JAZ: Proteína del gen *JASMONATE ZIM DOMAIN*

JAZ3: Gen *JASMONATE ZIM DOMAIN 3*

JIN1: Gen *JASMONATE-INSENSITIVE1*

JMT: Gen *JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE*

JMT: Proteína de *JMT*

l: Litro

LHY: Gen *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*

LHY: Proteína de *LHY*

LSD: En inglés, diferencia mínima significativa

MeJA: Metiljasmónico

miR172: Micro ARN 172

ml: Mililitro

MPK4: Gen *Mitogen-Activated Protein Kinase 4*

MPK4: Proteína de *MPK4*

MPK6: Gen *Mitogen-Activated Protein Kinase 6*

MPK6: Proteína de *MPK6*

nm: Nanómetros

°C: Grados centígrados

p: Peso

PCFS4: Gen *Pcf11p-SIMILAR PROTEIN*

PCR: En ingles, Reacción en cadena de la polimerasa

PDC: Planta de día corto

PDL: Planta de día largo

Phy: Fitocromo

pl: Plantas

PPR: *Pentatricopeptide repeat*

PPR7: Gen *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7*

PPR9: Gen *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9*

q-PCR: En ingles, Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

QTL: “*Quantitative trait loci*”

R: Rojo

RAP.2/TOE: Gen *RELATED TO AP2.7 (RAP2.7)/TOE1*

RCD1: Gen *RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1*

RL: Rojo lejano

RNS1: Gen *RIBONUCLEASA 1*

s: Segundo

SA: Hormona ácido Salicílico

SDG26/ASHH1: Gen *SET DOMAIN GROUP 26 (SDG26)/ASH1-RELATED PROTEIN 1 (ASHH1)*

SOC1: Gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*

SOD: Gen *SUPEROXIDE DISMUTASE*

SPL: Gen *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE*

SVP: Gen *SHORT VEGETATIVE PHASE*

svp: Planta mutante nula del gen *SVP*

SVP: Proteína de *SVP*

SYP122: Gen *SYNTAXIN OF PLANT 122*

syp122: Planta mutante nula del gen *SYP122*

TaFT: Gen homólogo de *FT* en trigo

T-DNA: En inglés, transgen de ADN

TEM: Gen *TEMPRANILLO*

TEM: Proteína de *TEM*

TFL1: Gen *TERMINAL FLOWER 1*

tfl1: Planta mutante nula del gen *TFL1*

TFL1: Proteína de *TFL1*

TFL2: Gen *TERMINAL FLOWER 2*

tfl2: Planta mutante nula del gen *TFL2*

TFL2: Proteína de *TFL2*

TOC1: Gen *TIMING OF CAB EXPRESSION 1*

toc1: Planta mutante nula del gen *TOC1*

TOC1: Proteína de *TOC1*

TOE1: Gen *TARGET OF EAT 1*

TSF: Gen *TWIN SISTER OF FT*

UTR: “*Untranslated region*”

UV-B: Ultra violeta B

v: Volumen

VIN3: Gen *VERNALIZATION INSENSITIVE 3*

VRN2: Gen *VERNALIZATION 2*

W: Watt

WT: Planta Wild-Type, genotipo salvaje.

ZTL: Proteína ZEITUPLE

α : Nivel de significância estadístico

RESUMEN

El fotoperíodo es la cantidad de horas de luz solar en un ciclo de 24 h. La percepción del fotoperíodo permite a las plantas ubicarse en las estaciones del año y ajustar la ocurrencia de procesos en los momentos más favorables, evitando los más adversos. Muchas plantas utilizan el fotoperíodo como señal ambiental que regula el cambio de la fase vegetativa hacia la fase reproductiva definiendo el tiempo a floración y determinando si el cultivar es de ciclo corto o largo. El objetivo de esta tesis es identificar los mecanismos que utilizan las plantas para integrar el paso de sucesivos ciclos con fotoperíodos inductores de la floración, como así también identificar otros procesos (además de la floración) controlados por las señales fotoperiódicas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en días cortos fueron transferidas a días largos (ciclos inductores) y se analizaron los cambios en la expresión de genes a medida que los ciclos sucesivos de días largos inducían más fuertemente la expresión. Proponemos un modelo en que la permanencia de los ciclos inductores actúa manteniendo niveles altos y relativamente estables de expresión del gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), más que incrementando los niveles máximos de expresión de *FT* con el correr de los ciclos. Además, demostramos que la señal fotoperiódica controla las defensas de las plantas a través de la señalización del ácido jasmónico (JA) y también el aborto de granos por medio de un mecanismo que involucra a las proteínas con arabinogalactanos (AGP).

Palabras Claves: Fotoperíodo, días largos, floración, FT, defensas y aborto.

ABSTRACT

The photoperiod is the duration of the light in a 24 h cycle. The perception of the photoperiod by plants provides them information about the season that helps to adjust the occurrence of sensible processes within the most favorable time of the year. Many plants use photoperiod as environmental signal that regulates the shift from the vegetative to the reproductive phase, defining flowering time and crop cycle length. The first objective of this thesis is to identify the mechanisms that plants use to integrate the occurrence of successive cycles with photoperiods able to induce flowering. A second objective is to identify other processes controlled by photoperiodic signals in addition to flowering. *Arabidopsis thaliana* plants grown under short days were transferred to long (inductive) days. Gene expression and flowering were analyzed in plants exposed to a different number of inductive cycles. Based on the result we propose a model where the persistence of inductive cycles enhances flowering by maintaining high and stable expression levels of FLOWERING LOCUS T (FT) rather than by increasing the maximum levels of FT expression. Furthermore, we show that photoperiodic signal controls plants defense by modifying the status of jasmonic acid signaling, and the abortion of seeds by altering the expression of genes encoding arabinogalactan proteins (AGP).

Key words: Photoperiod, long days, flowering, *FT*, defense y abortion.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

A. Las plantas, el ambiente y la floración

Las plantas, como todos los seres vivos, llevan adelante su ciclo de vida expuestas a un ambiente definido dentro de un rango de condiciones según su ubicación temporal y espacial. Pero a diferencia de muchos otros seres vivos, por ejemplo los animales, en las plantas el ambiente cumple una función reguladora de los procesos de crecimiento y desarrollo que se dan a lo largo del ciclo de vida. El ambiente tiene un rol protagónico en el ciclo de vida de las plantas y lo hace a través de los factores que lo componen como ser la temperatura, la radiación, las precipitaciones, los nutrientes, las características edáficas, la incidencia de enfermedades, la competencia de otras plantas, el ataque de plagas, etc. Todos estos factores afectan los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, que han adquirido evolutivamente mecanismos que les permiten percibir señales del ambiente y responder a las mismas de manera eficaz. La luz es uno de los factores ambientales que regula estos procesos en las plantas y lo puede hacer a partir de su calidad (composición del espectro luminoso), cantidad (flujo de fotones que alcanzan a las hojas), dirección (ángulo de incidencia sobre las plantas) o fotoperíodo (horas de luz en un ciclo diario). Estas señales luminosas se caracterizan por sus cambios que pueden ocurrir en el orden de segundos, minutos, horas, días o meses. La luz tiene un papel primordial en el ajuste de planta a su entorno, definiendo la germinación, la posición de las hojas, la arquitectura de la planta, el tiempo a floración y muchos otros aspectos de su cuerpo y funciones.

Las plantas inician su floración luego de un período vegetativo a través de un proceso denominado “Inducción Floral”. Este proceso está controlado por una sofisticada red de genes reguladores que monitorean cambios en el ambiente que tienden a favorecer que la floración ocurra en condiciones que maximicen el éxito

reproductivo y la producción de semillas. Los caminos que desencadenan a la floración son varios, los podemos agrupar en seis principales: 1- La vía Fotoperiódica, controla la floración en respuesta a cambios estacionales del largo de los días, 2- La vía de la Vernalización, controla la floración en respuesta a períodos prolongados de exposición a temperaturas bajas, 3- Vía de la temperatura ambiental, controla la floración en respuesta a las temperaturas diarias de crecimiento, 4- Vía autónoma, 5- Vía de las giberelinas y 6- Edad de la planta; estas últimas tres vías actúan de manera independiente a los estímulos ambientales (Fornara *et al.*, 2010). Sin embargo, esta clasificación es en buena medida arbitraria porque estudios más detallados van descubriendo interacciones más propias de una red que de vías de señalización independientes.

B. Control de la floración por el fotoperíodo

El fotoperíodo es la duración de la luz solar en un ciclo de 24 h. Un cultivo sembrado en un sitio determinado atravesará diferentes fotoperíodos según el mes de la siembra. Por ejemplo, en el hemisferio sur el cultivo de maíz (*Zea mays*) es sembrado en los meses primaverales y se cosecha cerca del comienzo del otoño, durante ese tiempo la longitud de los días aumenta hasta el 21 de diciembre y luego a medida que se avanza el tiempo decrece hacia el valor mínimo el 21 de junio. Muchas plantas utilizan la longitud del día como señal ambiental que regula el cambio de la fase vegetativa hacia la fase reproductiva. En la transición, los meristemas dejan de iniciar primordios foliares (fase vegetativa) y pasan a diferenciar primordios florales (fase reproductiva). Éste es un evento de importancia en el ciclo de vida de una planta, no solo porque queda definido el número de hojas, sino también porque comienzan a desarrollarse las estructuras (flores o flósculos, etc.) que conformarán el rendimiento en muchos de los

cultivos de interés agrícola. Además, el tiempo a floración determina si el cultivar es de ciclo corto o largo y en función de eso la utilidad que tendrá dentro de la estrategia de producción. Conociendo los factores involucrados en la fenología de los cultivos, podemos ajustar su ciclo de vida para que coincida con condiciones ambientales favorables y/o evite situaciones adversas. El control por el fotoperíodo ayuda a las plantas a ajustar la ocurrencia de la floración en las estaciones más favorables (Casal *et al.*, 2004).

En los comienzos del siglo XX Julien Tournois y Hans Klebs sugirieron que para inducir la floración es más importante el largo de los días que la cantidad de luz, pocos años después Garner y Allard demostraron de manera decisiva que la floración y otras respuestas eran inducidas por días largos (DL) en unas especies y por días cortos (DC) en otras especies (Lagercrantz 2009). Según los requerimientos fotoperiódicos, las plantas pueden ser clasificadas como plantas de día largo (PDL), plantas de día corto (PDC) o plantas neutras. Las PDL florecen o florecen más rápido en DL, en cambio, las PDC realizan lo mismo pero en DC (Thomas y Vince-Prue, 1997). Las plantas neutrales son indiferentes a los cambios en el fotoperíodo. Se han propuestos varios modelos que expliquen la percepción fotoperiódica, uno de ellos es el modelo “*Hourglass*” esquematizado en este caso para PDL (Fig.1.1-a). Este modelo planteaba la existencia de un metabolito endógeno que aumentaba con la luz solar y desencadenaba la floración una vez que superaba cierto umbral. Bajo DL este umbral era superado y la PDL florecía. Pero en DC el umbral no se supera y las PDL no florecen. Este modelo mostraba ciertas fallas ya que había experimentos en los que no se evidenciaba este funcionamiento, sólo servía cuando la sumatoria de horas de luz y oscuridad daba un número de 24 o múltiplo de 24. Estas observaciones sirvieron de fuerte apoyo a la teoría propuesta por Erwin Bünning en 1936, ésta decía que el metabolito endógeno estaba

regulado por el reloj circadiano (del latín *circa* que significa “alrededor de” y *dies*, que significa día) con un ritmo que variaba a lo largo del día. Para que la planta florezca debía coincidir la presencia de la luz solar con el metabolito endógeno en una cantidad que supere cierto umbral. Situación que sólo se daba cuándo los días eran largos (Fig.1.1-b). Este modelo se llamó de “*Modelo Externo de Coincidencia*”.

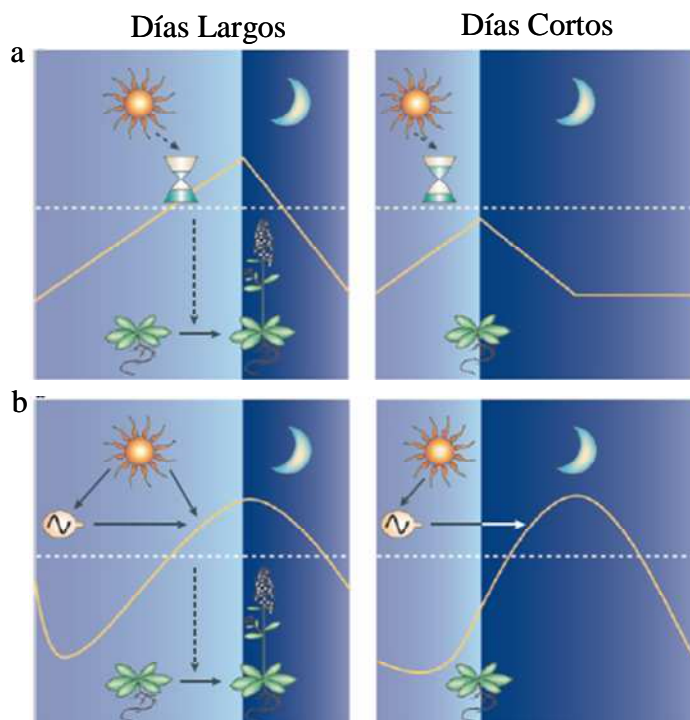


Figura 1.1: Modelos fisiológicos de percepción fotoperiódica. **a-** “*Modelo Hourglass*”. **b-** “*Modelo externo de coincidencia*”. Los esquemas de la izquierda corresponden a los días largos, los de la derecha corresponden a días cortos. Los modelos están esquematizados para plantas de día largo (PDL). Adaptado de Yanovsky y Kay, *Nature Reviews*, 2007.

Estos modelos y otros más, que competían entre sí, se postularon a lo largo del siglo pasado hasta que finalmente en el año 2002 se publica un artículo en el que afirman que el “*Modelo Externo de Coincidencia*” es el que utilizan las plantas para reconocer el fotoperíodo y florecer, mostrando además las bases de este mecanismo en plantas de

Arabidopsis thaliana (PDL) (Yanovsky y Kay, 2002). En breve, la percepción de DL depende de la coincidencia entre la expresión del gen *CONSTANS* (*CO*), el cual es controlado circadianamente (Suárez-López *et al.*, 2001) y la presencia de luz (Yanovsky y Kay, 2002). En los DL de las estaciones cálidas la coincidencia vuelve estable la proteína de *CO* porque la luz percibida por fotorreceptores específicos regula negativamente la degradación (Valverde *et al.*, 2004) y estimula la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), a su vez *FT* promueve la floración (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). La señal fotoperiódica se percibe en las hojas (Knott, 1936) y su producto, la proteína de *FT*, se mueve desde la hoja hacia el ápice (Turck *et al.*, 2008), señal denominada “Florigen” (Zeevaart, 2006). En los últimos 15 años se ha experimentado un gran avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la percepción de DL por parte de *Arabidopsis*.

Una observación tradicional en la fisiología de plantas es que estas requieren repetidos ciclos de fotoperíodos inductores para florecer. Hay pocas especies en que un único ciclo de fotoperíodo inductor promueve la floración (Ej.: *Xanthium strumarium*, *Pharbitis nil*, *Chenopodium robrum*, *Lolium temelentum* y *Hordeum vulgare* cv. *Wintex*) (Vince-Prue, 1994). Si una planta de *Arabidopsis* es expuesta a un único ciclo de fotoperíodo inductor no es suficiente para disparar plenamente la floración (Mozley y Thomas, 1995). Serán necesarios sucesivos ciclos de fotoperíodo adecuado para promover la floración, a pesar que un único ciclo es suficiente para inducir la expresión de *FT* (Suárez-López *et al.*, 2001; Yanovsky y Kay, 2002). El objetivo central de nuestro trabajo es investigar los elementos del sistema que integran la ocurrencia de múltiples DL para disparar la floración.

El requerimiento de repetidos DL decrece con la edad de la planta (Mozley y Thomas, 1995). En otras palabras, aunque uno o dos DL son insuficientes para inducir

la floración en plantas jóvenes, en plantas adultas ese mismo estímulo es suficiente para hacerlo. El mecanismo que provoca la caída del requerimiento no es conocido. Una de las posibilidades es que aumenten con la edad los niveles basales de algún regulador positivo de la floración como ser *FT*.

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos que les permiten a las plantas responder al fotoperíodo, nuestro conocimiento actual no explica adecuadamente la naturaleza cuantitativa de las respuestas fotoperiódica.

C. EL reloj circadiano de Arabidopsis thaliana

Un actor clave en el mecanismo de percepción fotoperiódica es el reloj circadiano. La rotación de la tierra alrededor de su eje, y su movimiento de traslación alrededor del sol, expone a todos los seres vivos a cambios diarios y estacionales en la cantidad de luz, temperatura y humedad del ambiente en el que habitan. La mayoría de los organismos poseen mecanismos que les permiten anticiparse a esos cambios recurrentes y ajustar distintos procesos fisiológicos y del desarrollo de modo que estos ocurran en ciertos momentos del día y del año (Yanovsky y Kay, 2003). Estos mecanismos son conocidos como relojes y calendarios biológicos. La habilidad de coordinar ciertos procesos de desarrollo a momentos particulares del año, cuando las condiciones ambientales tienden a ser más favorables, maximiza las probabilidades de supervivencia y éxito reproductivo (Jackson, 2009; Yanovsky y Kay, 2003).

Los relojes biológicos regulan múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos, que incluyen la fotosíntesis y el momento en el que florecen muchas especies vegetales (Harmer, 2009). Los ritmos diarios regulados por estos osciladores tienen una periodicidad cercana a las 24 h (McClung, 2008). Los ritmos persisten cuando las plantas pasan de condiciones cíclicas (condiciones de entrenamiento) a condiciones

continuas (condiciones de libre curso) indicando que los mecanismos de control del reloj tienen origen endógeno. Además, los ritmos son estables dentro de un rango de temperaturas fisiológicamente relevantes sin verse afectado con el patrón diario de temperaturas (McClung, 2008).

Los ritmos circadianos comúnmente presentan una forma sinusoidal al graficarlos en función del tiempo. Esas ondas pueden ser descritas por términos matemáticos como el período y la amplitud (Fig.1.2). En el caso de los relojes biológicos, se entiende como fase el momento del día (hora) en el que la respuesta estudiada obtiene el valor máximo; por ejemplo, si se estudia el perfil de expresión de un gen, el momento de máxima expresión. La amplitud, por su parte, se estima como la mitad de la distancia entre el máximo y el mínimo para determinada respuesta, y el período representa la distancia, en tiempo, entre máximos o mínimos sucesivos (McClung, 2006).

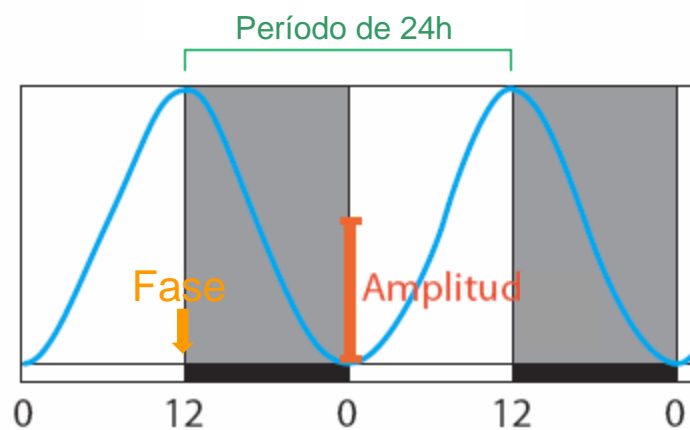


Figura 1.2: Modelo de una respuesta circadiana en condiciones de entrenamiento (ciclos de luz-oscuridad) en función del tiempo (horas). Se aprecian la amplitud (la mitad de la distancia entre el máximo y mínimo), el período (distancia entre máximos o mínimos) y la fase (hora de ocurrencia del valor máximo). Adaptado de Harmer 2009.

Dado que el período de los osciladores endógenos no es exactamente de 24 h y, a la vez, el momento del día en el cual se produce la salida y la puesta del sol varía durante el año en regiones alejadas del ecuador, los relojes circadianos son sincronizados, ó “puestos en hora”, diariamente. En efecto, los cambios diarios en los ciclos de luz/oscuridad y de temperatura ajustan el funcionamiento de los relojes endógenos de modo que distintos procesos mantengan una relación de fase apropiada con el amanecer y el atardecer (Harmer, 2009).

Tradicionalmente el reloj circadiano es dividido mecánicamente en tres componentes: *input* o señales de entrada (las que sincronizan al reloj), oscilador central y “*output*” o señales de salida (respuestas controladas por el reloj) (Fig.1.3). Esta primera aproximación es una representación muy simplificada ya que hoy día es imposible separar el “output” del “input” (Harmer, 2009).

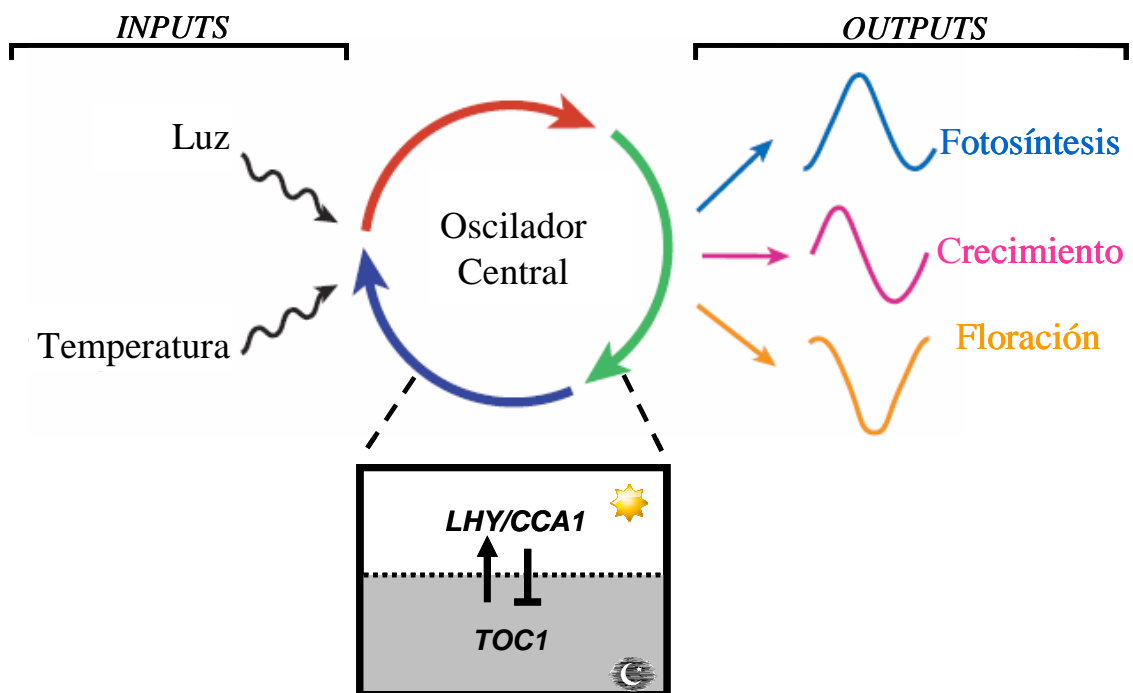


Figura 1.3: Mecanismo simplificado del funcionamiento del reloj circadiano. Los Inputs (Luz y temperatura), el oscilador central (los principales genes actúan en él,

LHY/CCA1 y TOC1) y los *Outputs* (procesos controlados por el reloj). Adaptado de Harmer 2009.

El modelo molecular que explica el funcionamiento del oscilador endógeno en *Arabidopsis* esta basado en una serie de múltiples “*loops*” de retroalimentaciones entrelazados de la siguiente manera: 1- el “*core loop*” que incluye a *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* (Alabadi *et al.*, 2001; Locke *et al.*, 2005a y 2005b); 2- el “*morning loop*” compuesto por *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9 (PPR9)* y *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 (PPR7)* que interactúan con *LHY/CCA1* (Locke *et al.*, 2006; Zeilinger *et al.*, 2006) y 3- el “*evening loop*” que incluye a *GIGANTEA (GI)* y a *ZEITUPLE (ZTL)* los cuales interactúan con *TOC1* y el “*core loop*” (Pokhilko *et al.*, 2010). Además, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* actúa como un componente del reloj circadiano como señal de entrada “*input*” (McWatters *et al.*, 2000) y *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* es un supuesto integrante más de “*core loop*” (Doyle *et al.*, 2002; McWatters *et al.*, 2007). De manera muy simplificada y sencilla, el “*core loop*” actúa de la siguiente forma: *TOC1* promueve la expresión *LHY* y *CCA1*, sus proteínas *LHY* y *CCA1*, se unen directamente al promotor del gen *TOC1*, reprimiendo su transcripción y completando un circuito de retro-alimentación negativa (Fig.1.3) (Alabadí *et al.*, 2001).

El mecanismo por el cuál las plantas sensan las señales de temperatura capaces de sincronizar el reloj no se han descripto hasta el momento. Sin embargo, se conocen algunas de las piezas involucradas en la cadena de señalización que ese factor abiótico desencadena. Se sabe que la transcripción de *CCA1*, *LHY*, *TOC1* y *GI*, es sensible a la temperatura (Harmer, 2009). La luz parece ser una de las señales más fuertes en cuanto

a su papel en la sincronización del reloj endógeno. En los últimos años se ha proporcionado evidencia genética y fotobiológica que indica que distintos fotorreceptores, entre ellos fitocromos y criptocromos, tienen un rol importante en el ajuste diario de los ritmos circadianos en las plantas (Somers *et al.*, 1998; Yanovsky, *et al.*, 2000a; 2000b).

Finalmente, es importante mencionar que existen otras señales capaces de sincronizar el reloj que no provienen del ambiente. Entre ellas podemos mencionar los niveles de metabolitos endógenos, por ejemplo intermediarios del nitrógeno orgánico, niveles hormonales, o citoquininas, brasinoesteroides y ácido abscísico (McClung y Gutiérrez, 2010). Por otro lado, se ha propuesto que los niveles endógenos de sacarosa, podrían funcionar como señal de sincronización (James *et al.*, 2008).

D. Mecanismos de percepción del fotoperíodo: Modelo GI-CO-FT

D.1. FT, el florigen

Como se anticipara brevemente en párrafos previos: el mecanismo que usan las plantas de *Arabidopsis* para identificar si es DL o DC se basa en la coincidencia de la expresión del gen *CO* y la presencia de luz (Yanovsky y Kay, 2002). El largo del fotoperíodo es percibido principalmente por los fotorreceptores criptocromo 2 (*cry2*) (Guo *et al.*, 1998) y fitocromo A (*phyA*) (Johnson *et al.*, 1994). Luego de que la señal lumínica es percibida por los receptores se integra en una compleja red de interacciones que modulan su impacto (Mazzella *et al.*, 2001).

CO y *FT* cumplen roles centrales en la respuesta al fotoperíodo, mutantes de *co* o *ft* florecen tardíamente bajo DL simultáneamente con plantas creciendo en DC (Koornneef *et al.*, 1998). *CO* codifica para una proteína nuclear que contiene un B-box zinc finger y un dominio CCT que interactúa con el promotor del gen *FT* y activa la

transcripción de *FT* (Samach *et al.*, 2000; Suarez-López *et al.*, 2001; Wenkel *et al.*, 2006). El reloj circadiano controla los niveles de ARNm del gen *CO*, el cual durante los DC tiene un máximo de expresión durante la noche y un mínimo en sus niveles de expresión en las horas centrales del fotoperíodo. Por lo tanto, en DC no coinciden en el tiempo la presencia de ARNm de *CO* y la luz (Fig.1.4).

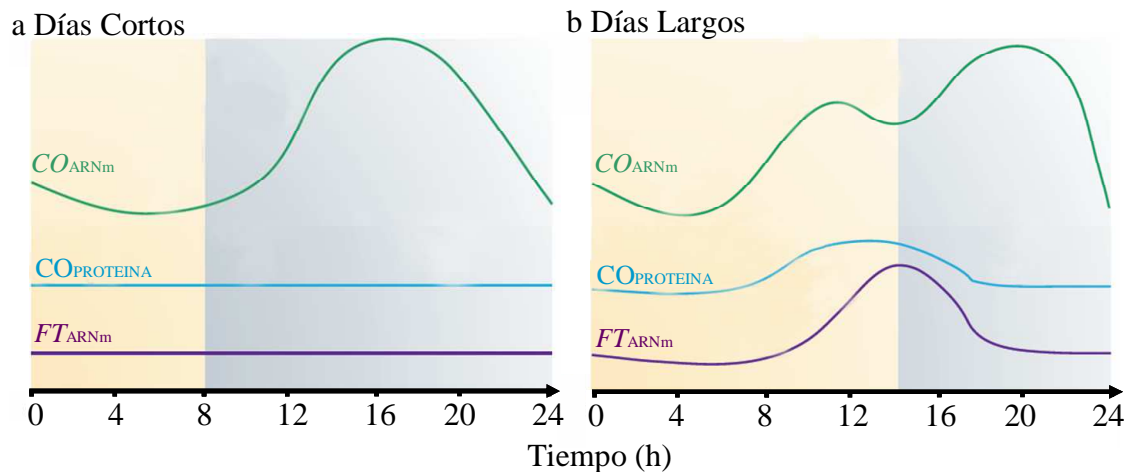


Figura 1.4: Patrones de expresión de ARNm de los genes *CO* y *FT* controlados por relojes circadianos y niveles de proteína de *CO* para días cortos (a) y días largos (b). Adaptado de Andrés y Coupland, *Nature*, 2012.

La proteína de *CO* producida bajo estas condiciones es rápidamente degradada por la ubiquitín E3 ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) en el proteosoma 26S (Valverde *et al.*, 2004; Fornara *et al.*, 2010). La coincidencia de ARNm de *CO* y la luz percibida por *phyA* y *cry2* es necesaria para la promoción de la expresión de *FT* (Yanovsky y Kay, 2002). En DL la coincidencia se logra gracias a la extensión de la duración de período lumínico y el incremento en la expresión de *CO* (Imaizumi y Kay, 2006). El ciclo de expresión de *CO* es modificado por DL. *GI* y *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1)* son importantes reguladores de la expresión del gen *CO*, forman un complejo dependiente de la luz para mediar la

degradación del factor de transcripción *CYCLING DOF FACTOR (CDF1)*, un represor de *CO* (Sawa *et al.*, 2007). La presencia de luz percibida por *phyA* y *cry2* estabiliza la proteína de *CO* (Valverde *et al.*, 2004). Bajo estas condiciones *CO* promueve la expresión de *FT* (Fig.1.5).

La proteína de *CO* presente en el floema de las hojas promueve la expresión de *FT* en estos tejidos (An *et al.*, 2004). En las hojas, la expresión de *CO* y *FT* es específicamente en los tejidos vasculares (Takada y Goto, 2003). De acuerdo con esto último, *cry2* en los haces vasculares, pero no en la epidermis o mesófilo, es capaz de rescatar el fenotipo de floración tardía de la mutantes *cry2* en plantas transgénicas que expresan el gen de *CRY2* en dicho tejido (Endo *et al.*, 2007). *FT* es un fuerte activador de la floración (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). La inducción local de *FT* en una sola hoja es suficiente para inducir la floración. La proteína del gen *FT* se mueve desde la hoja hacia el ápice sugiriendo que la proteína *FT* es un componente clave de la señal que comunica a estos órganos (Turk *et al.*, 2008). La ocurrencia de esta señal, llamada florigen, había sido propuesta en experimentos fisiológicos asociados con injertos o radiaciones localizadas (Zeevaart, 2006). Este modelo se denomina *GI-CO-FT*.

En el ápice, como muestra la Figura 1.5, un complejo entre *FT* y su homólogo *TWIN SISTER OF FT (TSF)* activan la expresión de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *FRUITFUL (FUL)* a través de *FD* (*FD* se expresa en el ápice antes de dispararse la inducción floral) (Torti *et al.*, 2012). *FD* aumentan la expresión de genes de identidad del meristema como ser *APETALA 1 (API)* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).

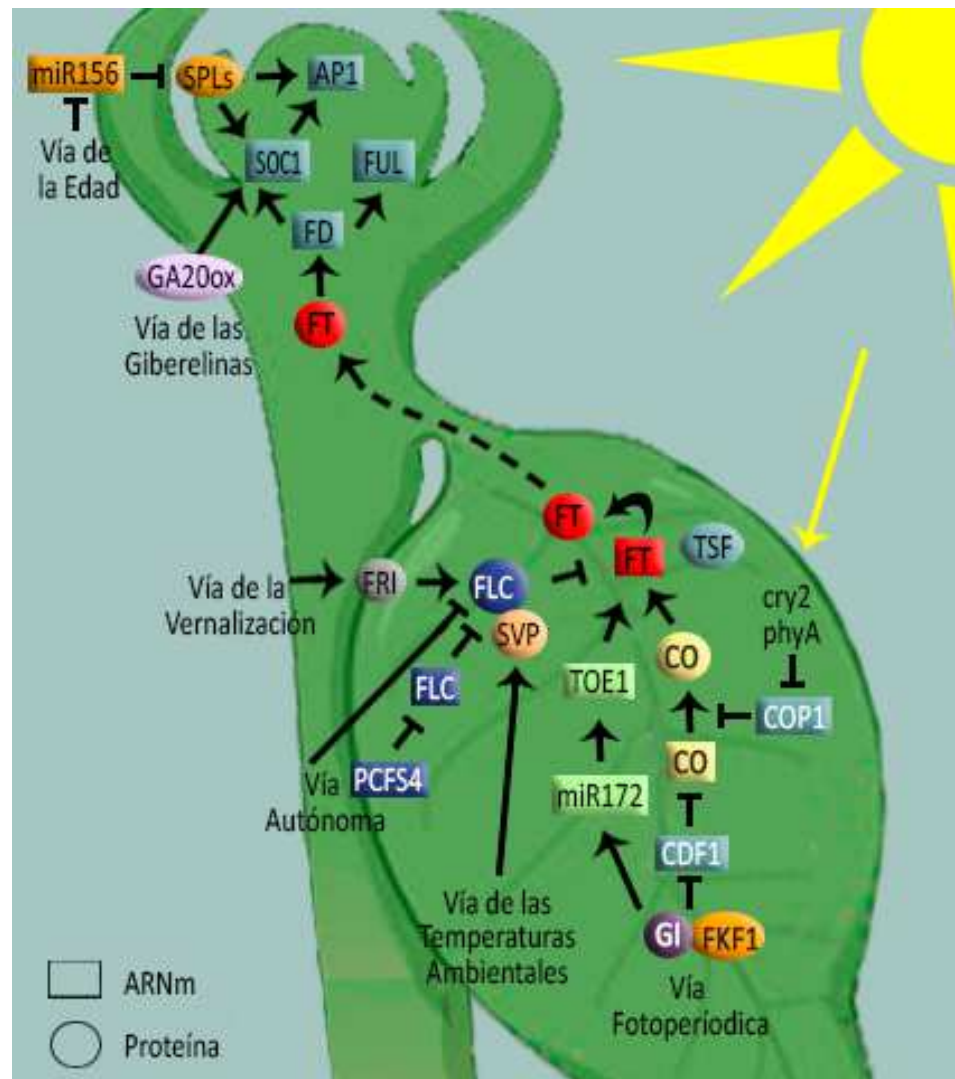


Figura 1.5: Esquema de vías a floración. La vía fotoperiódica está ubicada hacia la derecha de la hoja; la vía autónoma⁽¹⁾, la vía de la vernalización⁽¹⁾ y la vía de las temperaturas ambientales están ubicadas a la izquierda de la hoja. La vía de la edad y la vía de las giberelinas actúan directamente en el ápice. Los rebordes cuadrados indican transcritos (ARN) y los redondos proteínas. FT y SOC1 integran las señales que provienen de todas las vías de floración. Adaptado de Fornara et al., 2010.

⁽¹⁾ Estas vías ocurren en la hoja interactuando con FT como también en la ápice interactuando con SOC1.

D.2. *El rol de GIGANTEA*

El gen de *Arabidopsis GI* codifica para una proteína con seis posibles dominios que atraviesan la membrana (Fowler *et al.*, 1999), que se expresa en todas las etapas del desarrollo de la planta y en todos los órganos y tejidos con un máximo nivel de expresión en ápices de inflorescencias, flores y silicuas jóvenes; y un mínimo nivel en silicuas maduras y raíces (Park *et al.*, 1999). *GI* está bien conservado en plantas, incluyendo monocotiledóneas como el arroz (*Oriza sativa*) (Hayama *et al.*, 2002) y gimnospermas como el *Pinus tadea*. En contraposición, los homólogos de *GI* están ausentes en los animales (Mittag *et al.*, 2005; Mizoguchi *et al.*, 2005). El gen *GI* de *Arabidopsis* participa en la promoción de la floración actuando en parte a través de *CO* (Sawa *et al.* 2007). La mutación *gi* tiene efectos pleiotrópicos, además de su efecto sobre el tiempo de floración, mutantes *gi* tienen hipocotilos largos (Araki y Komeda, 1993) y son resistentes al herbicida paraquat (Kurepa *et al.* 1998). *GI* actúa como parte de la red de señalización de sacarosa y podría funcionar como un “input” metabólico del reloj circadiano de *Arabidopsis* (Dalchau *et al.*, 2011). Plantas mutantes *gi* acumulan almidón bajo algunas condiciones, pero los niveles de almidón altos no son la causa del fenotipo de floración tardía de mutantes *gi* (Eimert *et al.*, 1995; Hollis, 1999). También se ha visto que plantas mutantes *gi-3* aumentan la tolerancia al estrés oxidativo y esto está asociado a la activación constitutiva de los genes *SUPEROXIDE DISMUTASE* (*SOD*) y *ASCORBATE PEROXIDASE* (*APX*) (Cao *et al.*, 2006). La tolerancia al congelamiento también está regulada positivamente por *GI* sugiriendo que hay alguna interacción entre las respuestas de tiempo a floración y estrés por frío a través de *GI* en *Arabidopsis* (Cao *et al.*, 2005). En otras especies se ha visto homólogos de este promotor de la floración en “ryegrass” (*Lolium perenne*) (Langdon *et al.*, 2009), en rábano

(*Raphanus sativum*) (Curtis *et al.*, 2002), en la floración y maduración de la soja (*Glicine max*) (Watanabe *et al.*, 2011) y arroz (Hayama *et al.*, 2003).

El gen *GI* está involucrado en el control de la respuesta fotoperiódica a la floración: el tiempo de floración se retrasa fuertemente bajo DL en mutantes *gi*. Los análisis de expresión de *GI* a través de ciclos de Luz/Oscuridad muestran que está regulado por el reloj circadiano y su expresión alcanza su punto máximo durante la fase de luz, además, el patrón de *GI* difiere en DL y DC (Millar y Kay, 1996). Las mutaciones *gi-1* y *gi-2* reducen el largo del período del reloj circadiano en el movimiento de hojas, *gi-1* causa un similar efecto en la expresión del gen *CHLOROPHYLL a/b BINDING PROTEIN (CAB)* mientras que *gi-2* causa un alargamiento del ritmo de expresión del mismo gen (Park *et al.*, 1999). La señalización del fitocromo B (PhyB) también está alterada en los mutantes *gi* (Huq *et al.*, 2000), sugiriendo que los cambios en el reloj circadiano pueden deberse a la interrupción en la señal de entrada lumínica controlada por los fitocromos. Pero en Oliverio *et al.* (2005) documentan que si bien *GI* afecta la señalización de *PhyA* esto es independiente y no involucra al reloj circadiano. Siguiendo con la luz, el mutante *gi-1*, no cambia el largo del período circadiano en respuesta a un incremento en la intensidad lumínica como si lo hacen las plantas de genotipo salvaje (WT) (Park *et al.*, 1999).

Miszoguchi *et al.*, (2005) demuestran que *GI* posee al menos dos funciones distintas: 1- Efecto general en controlar el reloj circadiano (detallado anteriormente), 2- Activar el “output” de la promoción de la floración. *GI* y *FKF1* son importantes reguladores de la expresión del gen *CO* (Sawa *et al.*, 2007). La expresión de *GI* está controlada por el reloj circadiano y tiene un pico máximo alcanzando el final del día. Sawa *et al.* (2008) determinaron que *GI* y *FKF1* forman un complejo dependiente de la luz para mediar la degradación de CDF1, un represor de *CO*. Específicamente, en DL, la

expresión de *GI* y *FKF1* tienen un pico en el mismo momento formando cantidades óptimas del complejo GI-FKF1 (Fig.1.5). En DC, la expresión de *GI* alcanza sus valores máximos unas pocas horas antes que el pico de expresión de *FKF1* resultando en bajos niveles del complejo GI-FKF1 y por consiguiente la permanencia de CDF1. Para promover la expresión de *CO* es necesario un suficiente nivel de complejo GI-FKF1 que solo se da bajo condiciones de DL (Sawa *et al.*, 2008). Estudios anteriores indican que *GI* puede promover las respuestas fotoperiódicas a la floración a través del camino de *CO* y *FT* o también por alguna ruta paralela e independiente a ésta (Mizoguchi *et al.*, 2005). Además del efecto de *GI* vía *CO*, según Jung *et al.* (2007) *GI* regula la expresión *miR172* que a su vez regula la floración vía fotoperiódica induciendo a *FT* independientemente de *CO*. En efecto, *TARGET OF EAT 1 (TOE 1)*, uno de los blancos de *miR172*, regula a su vez la expresión de *FT* de forma paralela a *CO*. La abundancia de *miR172* es controlada por el fotoperíodo mediante un procesamiento del miARN regulado por *GI* (Fig.1.5). Plantas que sobre producen el *miR172* aceleran su floración en DL y DC, incluso en ausencia del gen *CO*, indicando que *miR172* promueve la floración fotoperiódica por un camino genético que es independiente al de *CO* (Jung *et al.*, 2007). Por últimos *GI* también interactúa directamente con la región promotora de *FT* (Sawa y Kay, 2011). En resumen, *GI* regula la floración fotoperiódica por tres caminos: 1- Vía *CO*, 2- Vía *miR172* y 3- Vía directa a *FT*.

E. Otros controles de la floración

El mecanismo de detección del fotoperíodo es uno de los 6 principales caminos que regulan la floración en plantas (Levy *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 2004; Fornara *et al.*, 2010) (Fig.1.5). La vía de las temperaturas ambientales acelera la floración de plantas de *Arabidopsis* creciendo a altas temperaturas (23°C) en comparación a temperaturas

bajas (16°C) en un mecanismo que involucra al gen *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) (Fornara *et al.*, 2010). La vía de la edad que implica el aumento en el tiempo de las concentraciones del factor de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE* (*SPL*) que es promotor de *API*, *FUL* y *SOC1*. Las giberelinas (GA) promueven la floración bajo fotoperíodos cortos, estas hormonas son esenciales para que el evento ocurra en fotoperíodos no inductores (DC), plantas mutantes que reducen los niveles de GA (por una menor biosíntesis o por una mayor degradación) retrasaron su floración (Mouradov *et al.*, 2002; Olszewski *et al.*, 2002; Fornara *et al.*, 2010). La vernalización es otro de los caminos que regula la floración y consiste en la exposición de las plantas a bajas temperaturas. Muchas plantas que florecen tarde logran acelerar su tiempo a floración si son expuestas a bajas temperaturas. La respuesta a la vernalización está mediada por los alelos dominantes de dos genes, *FRÍGIDA* (*FRI*) y *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), que reducen la expresión de *FT* (Michaels y Amasino, 1999; 2001) (Fig.1.5). En *Arabidopsis* *FRI* actúa incrementando la expresión de *FLC*, altos niveles de *FLC* retrasan la floración. La vernalización promueve la floración en plantas de invierno a través de efectos epigenéticos que reprimen la expresión de *FLC* (Scortecci *et al.*, 2003). Esto requiere la modificación de las histonas de la cromatina en el locus de *FLC*, alguno de los genes necesarios para ello son *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) y *VERNALIZATION 2* (*VRN2*) (Fornara *et al.*, 2010).

Por último, las plantas poseen un mecanismo de floración constitutivo que se denomina “vía autónoma” (Fig.1.5). Aquellas plantas con respuesta fotoperiódica cuantitativa que no hayan recibido el estímulo por la vía fotoperiódica terminarán floreciendo por vía autónoma, aunque mucho tiempo después. Mutantes de genes asociados a la vía autónoma no tienen alteradas las respuestas fotoperiódicas (Scortecci *et al.*, 2003).

El gen de *Arabidopsis SVP* es un factor de transcripción de familia de MADS-box, que actúa como un regulador negativo de la transición floral en *Arabidopsis* cuya expresión no es afectada por el fotoperíodo ni por la vernalización, mutantes nulos *svp* de *Arabidopsis* aceleran la floración en comparación con plantas WT (Hartmann *et al.*, 2000). *SVP* reprime la transcripción de *FT*, *TSF* y *SOC1*, por lo que *svp* acelera la floración tanto en DC como en DL (Jang *et al.*, 2009). En DL, plantas que sobreexpresan *SVP* retrasan su floración al igual que mutantes *co-2* en comparación con el WT, el doble mutante *SVP-ox co-2* retrasa aún más su floración aludiendo a un efecto aditivo en la respuesta denotando que la vía de *SVP* y la de *CO* son independientes (Yoshida *et al.*, 2009) (Fig.1.5). Estos mismos autores vinculan a *SVP* con genes del reloj circadiano como *ELF3*, *LHY* y *CCA1*, éstos intervienen en la acumulación de la proteína SVP sugiriendo que *LHY/CCA1* regula negativamente a *FT* posiblemente vía *ELF3-SVP/FLC* (Fig.1.5).

TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) es un gen de la misma familia de *FT*, ambos son importantes reguladores del control del desarrollo floral en *Arabidopsis* pero *TFL1* actúa inhibiendo a la floración (Yoo *et al.*, 2010). El mutante *tfl1-1* limita el desarrollo normal de una inflorescencia indeterminada promoviendo la formación de meristemas florales terminales, acelera la floración en comparación al genotipo salvaje tanto en DC como en DL (Shannon y Meeks-Wagner, 1991).

Pcf11p-SIMILAR PROTEIN (PCFS4) es un promotor de la floración involucrado en la vía autónoma, sin participación en la respuesta fotoperiódica ni de vernalización (Xing *et al.*, 2008) (Fig.1.5). El retraso en la floración de plantas mutantes del gen *PCFS4* está mediado por *FLC* y su cadena de transducción aguas abajo. *PCFS4* estaría envuelto en una poliadenilación del gen *FCA* necesaria para suprimir la expresión de *FLC* (Xing *et al.*, 2008).

Un jugador clave en la transición floral en *Arabidopsis* es el gen represor de la floración *FLC* (Marquardt *et al.*, 2006). Éste es un represor transcripcional MADS box que se expresa predominantemente en los ápices de tallos y raíces y en los tejidos vasculares. Su función es bloquear la expresión de los genes *FT* y *SOC1* (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999; 2000). A su vez, los niveles de *FLC* son regulados por genes envueltos en la vía autónoma como son *FCA*, *FY*, *FLD*, *FPA*, *FVE*, *LD* y *FLK* (Marquardt *et al.*, 2006). La característica principal de los mutantes de estos genes es que contienen niveles atípicos de transcritos de *FLC* en comparación con plantas salvajes o con mutantes de floración tardía asociados a los mecanismos de floración fotoperiódicos o de las GA (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999; 2000). Si bien *FLC* codifica para un factor de transcripción que no tiene una función vinculada al reloj circadiano, plantas mutantes de *FLC* tienen alterado su período circadiano. A su vez, la vernalización modifica los niveles de *FLC* como también a los periodos circadianos (Salathia *et al.*, 2006) (Fig.1.5). Esto nos permite pensar que pueden existir interacciones entre los distintos mecanismos de floración. Por ejemplo, si *FLC* afecta los relojes circadiano y los genes de vía autónoma regulan los niveles de *FLC*, podremos encontrar mutantes de la vía autónoma que tengan alterada las respuestas al fotoperíodo.

F. *Objetivos y justificación*

El desafío de cubrir la demanda mundial de alimentos es continuo y creciente, la superficie cultivable comienza a ser limitante y el mejoramiento genético se torna un factor clave (Evans, 1998; Calderini *et al.*, 1999). Ajustar la duración del ciclo de los cultivos a las condiciones óptimas fue determinante en el progreso de los rendimientos (Slafer *et al.*, 1994). Habiendo cumplido este objetivo, hoy, el mejoramiento apunta a un mayor aprovechamiento de los recursos haciendo más eficiente la partición de los mismos dentro de las fases vegetativas y reproductivas (Siddique *et al.*, 1989; Slafer *et al.*, 1999). Largos de ciclo fijos y fases reproductivas más extensas son entonces el anhelo de los mejoradores para aumentar de forma significativa los rendimientos (Upadhyay *et al.*, 1994; Summerfield *et al.*, 1998).

Distintos estudios han demostrado que cambios en el fotoperiodo afectan las etapas de desarrollo vegetativa y reproductiva (Riddell *et al.*, 1958; Miralles y Richards, 2000; Kantolic y Slafer 2001; 2005). Conocer cada vez con más profundidad los mecanismos y procesos que gobiernan el comportamiento de las plantas a estas señales lumínicas nos permite seguir progresando en estos aspectos.

El primer objetivo de esta tesis es identificar los mecanismos que utilizan las plantas para registrar el paso de sucesivos fotoperíodos inductores de la floración. Por ejemplo, en una planta que para desatar la floración requiere varios fotoperíodos inductores es necesario no sólo percibir que el fotoperíodo es inductor sino también contar el número de ciclos inductores. El mecanismo de coincidencia le servirá a la planta para identificar el fotoperíodo de ese día pero ¿Cuál es el mecanismo que le permite a la planta distinguir entre DL sucesivos? Ésta es la pregunta que motiva nuestro estudio.

Los objetivos parciales incluyen: 1- Ajustar un sistema en el cual se manifieste el efecto fisiológico de aceleración de la floración al aumentar el número de ciclos inductores, 2- Caracterizar el cambio en el transcriptoma de la planta en la medida que pasan los sucesivos DL, 3- Evaluar mediante mutantes la función de genes con patrones de expresión que conjeturen una participación en la integración del número de ciclos inductores.

Además de la floración, el fotoperíodo es una señal ambiental que regula otros procesos como la tuberización en papa (*Solanum tuberosum* spp. *Andigena*), o el cese del crecimiento y brotado de yemas en especies anuales (Lagercrantz, 2009). En el transcurso de la tesis hemos obtenido evidencias del control fotoperiódico de procesos importantes como los niveles de defensa ante hongos y el nivel de aborto de granos. Un segundo objetivo de esta tesis es poner a prueba estas hipótesis.

G. Material Vegetal ¿Porqué usamos *Arabidopsis thaliana*?

La identificación de los mecanismos que permiten distinguir el DL del DC en *Arabidopsis* ha permitido avanzar en el conocimiento de la percepción fotoperiódica en especies de interés agrícola (Andrés y Coupland, 2012). La función de muchos genes envueltos en las respuestas al fotoperíodo están conservados entre *Arabidopsis* (PDL) y arroz (PDC), sugiriendo que la respuesta diferencial entre ambas plantas resulta de una interacción opuesta entre dos genes, *CO* y *FT* (Hayama *et al.*, 2003). En arroz se ha identificado al gen *Heading date 1* (*Hd1*), gracias a su homología con *CO* de *Arabidopsis* (Yano *et al.*, 2001). Este gen reprime la floración en DL inhibiendo la transcripción de *Hd3a* que es homólogo de *FT*, pero promueve su expresión en DC (Kojima *et al.*, 2002). El gen *GI* de arroz promueve a *Hd1* de la misma manera que *GI* a *CO* en *Arabidopsis* (Hayama *et al.*, 2002; Andrés y Coupland, 2012). También en

cebada (*Hordeum vulgare*) fueron aislados genes con estructura similar a la de *CO* (Griffiths *et al.*, 2003) que promueve la expresión de *HvFT* (homólogo de *FT*) en DL (Campoli *et al.*, 2012). En trigo (*Triticum aestivum*) se ha identificado un gen similar a *FT* de *Arabidopsis* denominado *TaFT* el cuál integra señales de fotoperíodo y vernalización promoviendo la floración (Li *et al.*, 2008). En el mismo trabajo se mostró que *TaFT* promueve al gen de identidad del meristema *VRN1* por medio de la interacción con las proteínas de *TaFDL2*, sugiriendo que *TaFDL2* es homólogo del gen *FD* de *Arabidopsis* que interactúa con *FT* y estimula la floración. También en plantas de trigo y cebada se encontró que el gen *VRN3*, involucrado en la vernalización, es un ortólogo de *FT* (Yan, 2006). Incluso, se han encontrado muchos genes de floración de *Arabidopsis* representados en leguminosas, muchos de ellos fueron aislados y secuenciados en arveja (*Pisum sativum*) (Hecht *et al.*, 2005). En soja se han identificado las secuencias de *GI*, *CO* y *FT* y sus patrones de expresión son similares a los de *Arabidopsis* exceptuando por *FT* que responde de manera inversa a los DL por tratarse de una PDC (Thakare *et al.* 2010). *E2*, un gen de soja que afecta la sensibilidad fotoperiódica, codifica para *GI* (Watanabe *et al.*, 2011) y *CO*, en soja, afecta directa o indirectamente a *FT* (Xia *et al.*, 2012).

La utilidad de haber encontrado genes centrales de las respuestas fotoperiódicas en *Arabidopsis* se extiende incluso a procesos distintos a la floración. Se han obtenido evidencias que indican que en plantas de papa la tuberización en DC está controlada por ortólogos de *CO* y *FT* (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Estos antecedentes permiten suponer que los genes que se encuentren vinculados a la percepción de ciclos inductivos repetidos en *Arabidopsis* podrán ser de utilidad para entender el fenómeno en especies de interés agrícola.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivo de plantas de Arabidopsis thaliana

Las semillas de *Arabidopsis* utilizadas en esta tesis son del ecotipo Columbia (Col0) y fueron sembradas en cajas plásticas de 4 cm de largo, 3 cm de ancho y 2 cm de alto con Agar-Agar al 1%. Las semillas fueron estratificadas en oscuridad a 5 °C durante 4 d en una incubadora marca Forma Scientific. Luego, las cajas pasaron a una cámara con fotoperíodo de DC (8 h de luz y 16 h de oscuridad) con una temperatura constante de 22 °C controlada por un aire acondicionado marca Surey de 3000 frigorías, hasta que las semillas germinaron y dieron origen a plántulas de 5 d. Entonces, se trasplantaron las plántulas a macetas plásticas de 70 cm³ de volumen, 7 cm de alto y 3.5 de diámetro. Éstas contenían una mezcla de perlita, vermiculita y turba con una composición de 40 %, 40 % y 20 %, respectivamente, que permanecieron en la misma cámara. La radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) medida con un radiómetro LI-COR LI-188B era de 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lograda con 10 tubos fluorescentes de 36W marca Philips de luz blanca. Las plantas fueron regadas con solución nutritiva de Hakaphos (1 g/l) y crecieron libres de enfermedades, deficiencias hídricas y nutricionales.

Los mutantes utilizados fueron: *ft-10* (Rosso *et al.*, 2003), *gi-2* (David *et al.*, 2006), *tfl1-1* (Shannon y Meeks-Wagner, 1991), *flc-3* (Micheals y Amasino, 1999), *myc2/jin1-2* (Lorenzo *et al.*, 2004), *cop1-4* y *cop1-6* (McNellis *et al.*, 1994), *phyA cry1 cry2* (Mockler *et al.*, 2003), *fla9-1* (SALK_051688C), *fla9-2* (SALK_088265), *svp-31* (SALK_026551C), *pcfs4-1* (SALK_102934C). Todos tuvieron fondo genético de Columbia. Las líneas “SALK” presentadas en este trabajo, provienen del *SALK Institute Genomic Analysis Laboratory* y son mutantes por inserción de T-DNA (Czechowski *et*

al., 2005). La homocigosis de esa inserción fue verificada por PCR (BIO-RAD MyCycler Version 1.065) con el siguiente protocolo: 3' 95°C (1X); 30'' 95°C, 30'' 55°C, 30'' 72°C (35X); 10' 72°C (1X). Los “*primer*” utilizados fueron:

-*fla9-1*(Lp) TTTTCCGTCCTCAAGTGTGTTG

-*fla9-1*(Rp) CCCTAAACCAGTTAAGCCCTG

-*fla9-2*(Lp) TTCCAATTGGATCCTTGTTTC

-*fla9-2*(Rp) TGGCCAAGTCAATACAAAACG

-*svp*(Lp) TCCAATAACCACCACACACAG

-*svp*(Rp) TGCATATCCAGATTTACATCTTTTGG

-*pcfs4*(Lp) CTTGGAGCCATAGCAGATGAG

-*pcfs4*(Rp) TATGCATCATGTGTCGTTTGG

B. Tratamientos fotoperiódicos

Los plantas fueron expuestas a ciclos de DC, (16 h de oscuridad y 8 h de luz) o DL (8 h oscuridad y 16 h de luz). Los tratamientos fotoperiódicos consistieron en distinto número de ciclos inductores es decir de ciclos de DL. Luego de 24 d de crecimiento en DC (10-12 hojas aproximadamente) comenzábamos a exponer a las plantas a DL durante 0 (continuaban con DC), 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 DL (ciclos inductores) antes de retornar al DC. Cuando algunas plantas eran tratadas con DL, las que debían ser expuestas a DC eran manualmente colocadas en oscuridad las últimas 8 h del día. El aislamiento en oscuridad lo lográbamos con cajas de cartón de 100 cm de largo, 70 cm de ancho y 30 cm de alto. Envolvíamos las bandejas con las plantas en papel de aluminio alcanzando una radiación de $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en su interior.

C. Medición del tiempo a floración

El número de hojas de la roseta fue determinado para cada planta, cuando el tallo principal alcanzaba 1 cm de alto. En cada experimento se cuantificaron las hojas de 10 plantas (aproximadamente) para cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido del *test* de menor diferencia significativa (LSD) de Fisher para comparación de medias.

D. Extracción de ARN y análisis de expresión global de genes mediante microarreglos

En este caso la estratificación de semillas siguió el mismo protocolo que en experimentos fisiológicos pero una vez transcurridos los 5 d de frío las semillas se sembraron directamente en las macetas con sustrato para que germinen, luego se cultivaron las plantas bajo las mismas condiciones de cámara antes mencionadas. Se cosecharon las hojas de las plantas con nitrógeno líquido (-170 °C) y se extrajo su ARN utilizando el RNeasy Miniprep kit (Quiagen). Los parámetros de calidad fueron $260/280=2.1$ y $260/230=1.9$ en una concentración de $0.57 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mediante el servicio de procesamiento de microarreglos del IFEVA se realizó la hibridación de los microchips desarrollados por la compañía Affymetrix que contienen oligonucleótidos de ADN que representan aproximadamente 24000 genes diferentes. Los chips se realizaron por duplicado (muestras biológicas independientes) para cada punto a muestrear.

Los datos de expresión fueron normalizados con la suma de cada microarreglo (Clarke y Zhu, 2006). El análisis de los genes de expresión fue restringido a aquellos genes que mostraban P (presencia en el software Affymetrix) en ambas repeticiones de al menos una de las condiciones experimentales, quedando así 15324 genes. Para evaluar la respuesta a los DL cada uno de estos genes fue sometido a un ANOVA de

dos vías. Esta extensa información debió ser analizada cuidadosamente para reducir las probabilidades de considerar genes que se expresan significativamente cuando en realidad eso no sucede (falso positivo). Storey y Tibshirani (2003) proponen un método para el manejo de este tipo de información a través del cálculo de un valor “ q ” que permite conocer la probabilidad de ocurrencia de “falso positivos” dentro de un conjunto considerado como significativamente afectados. El valor “ q ” se obtiene a partir de “ p ”. Se seleccionaron 7096 genes cuya expresión se alteró ante algunos de los ciclos inductores con efecto significativo con $p < 0.05$ y un valor de $q < 0.012$.

E. Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (q-PCR)

Para el estudio de la expresión génica mediante q-PCR, el material biológico utilizado proviene de hojas de plantas de aproximadamente 24 días, crecidas en macetas como se indica para los experimentos de análisis de expresión con microarreglos y según el tratamiento fotoperiódico que se indica en cada caso.

Para extraer el ARN total de las hojas se utilizó TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes. El ARN purificado se sometió a un tratamiento con ADNasa, empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega). A partir de 1 μg de ese ARN, se sintetizó ADNc utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen) y oligo-dT primer.

La expresión de distintos genes fue medida por q-PCR. Para llevarla a cabo el ADNc sintetizado previamente, fue amplificado utilizando SYBR Green Master (Roche) y el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los genes PPR (*Pentatricopeptide repeat*, At1g62930) fueron empleados como control para relativizar la expresión e independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de

retro-transcripción. El cálculo de la expresión se realizó utilizando una curva patrón.

Los “*primers*” utilizados fueron:

-*GI(fw)* AAGATGGGCTGTTGCAATGGAG

-*GI(rv)* GTTGGCGGAGGAAGAAGAAGTG

-*PPR(fv)* GAGTTGCGGGTTTGTGGAG

-*PPR(rv)* CAAGACAGCATTTCCAGATAGCAT

F. *Bioensayos con Botrytis cinera*

Aplicamos 5µL de esporas de *Botrytis cinerea* (2-3 10⁵ esporas mL⁻¹) sobre la cara adaxial de 4 hojas maduras en plantas de *Arabidopsis* de 24 d cultivadas en las mismas condiciones antes mencionadas (A.2). Al mismo tiempo de ser inoculadas, un grupo de plantas continuaban creciendo en DC y el otro grupo pasaba a fotoperíodo de DL. Tomamos la precaución de colocar las macetas en bandejas y envolver la bandeja en papel film para generar una cámara húmeda que prevenga la deshidratación de la inoculación (Muckenschnabel *et al.*, 2002; Cerrudo *et al.*, 2012). La infección tuvo progreso durante 48 h, pasado ese tiempo las hojas fueron cosechadas para evaluar la superficie del daño con ayuda del programa Adobe PhotoShop CS3. Los resultado se analizaron estadísticamente a través de un ANOVA con una prueba de medias de LSD de Fisher ($\alpha=0.05$).

G. *Cuantificación de la tasa de aborto en silicuas de Arabidopsis*

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* creciendo siempre en cámaras de DC y DL. Llegando al fin de su ciclo, luego de la floración y fructificación, la silicua de color verde comienza a tornarse amarilla desde el extremo distal a la planta. Al momento que el 30% de la silicua perdió el color verde y antes que comiencen a abrirse, cosechamos

las silicuas y las colocamos en alcohol 96%. La inflorescencia se dividió en tres estratos y se tomaron aproximadamente 5 silicuas del estrato inferior y del medio. La cuantificación se realizó bajo lupa. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de un ANOVA con una prueba de medias de LSD de Fisher ($\alpha=0.05$).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE I)

EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DEL TIEMPO A FLORACIÓN

A. Dinámica de la transcripción de genes a floración: Balance de Fuerzas.

La regulación fotoperiódica de la expresión de los principales genes que componen el modelo *GI-CO-FT* está bien descripta y ya fue presentada en la introducción. Para poder abordar la respuesta del transcriptoma a la transición entre condiciones no inductoras y la exposición a un número variable de ciclos inductores es conveniente analizar previamente el estado estacionario del transcriptoma en DL y DC. Para eso tomamos una base de datos disponible públicamente con los patrones de expresión génica a lo largo de las 24 h para plantas de *Arabidopsis* creciendo en DL y DC (Micheal *et al.*, 2008). Seleccionamos los genes funcionalmente relacionados al tiempo a floración a partir de una lista confeccionada con información provista por TAIR (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org). Los resultados de algunos genes se muestran en la Figura 3.1 (la lista completa de genes se presenta en la Tabla S.1 del APÉNDICE). Vemos que los DL (que inducen la floración), en comparación a los DC, inducen la expresión de genes que promueven la floración como *FZO-LIKE* (*FZL*) y *SAL1/FIERY1* (*FRY1*). Plantas mutantes de estos genes tienen floración tardía, (Gao *et al.*, 2006; Kim y Von Arnim, 2009). *FZL* es un miembro específico de la superfamilia “*dynamin*”, la cual está vinculada a los cloroplastos (Valverde *et al.*, 2004) y su conexión con el control fotoperiódico de la floración no está bien descripto. *SAL1/FRY1* codifica a una enzima con “*polyphosphate 1-phosphatase*” y “*3'(2'), 5'-bisphosphate*” de actividad nucleosidasa (Quintero *et al.*, 1996), la cual promueve la expresión de *FT* sin afectar la expresión de *CO* (Kim y Von Arnim, 2009). También los DL, en comparación a DC, inhiben la expresión de genes que reprimen la floración como: *TERMINAL FLOWER 2* (*TFL2*)/*LIKE HETEROCHROMATIN*

PROTEIN 1, *ELF3* y *TEMPRANILLO (TEM)*. El mutante *tfl2* florece mucho más temprano que el WT bajo fotoperíodos cortos o largos y muestra una alta expresión de *FT* (Kotake *et al.*, 2003). TFL2 co-localiza con genes (incluyendo *FT*) que poseen nucleosomas con residuos trimetilados de lisina en la posición 27 de histona 3 (Turk *et al.*, 2007), y está implicado en la represión de la expresión en *FT*, debido a un efecto negativo sobre un elemento potenciador ubicado entre 1,0 y 4,0 kb “*upstream*” del codón de inicio de *FT* (Adrian *et al.*, 2010). TEM altera el 5 UTR de *FT* reprimiendo la expresión de *FT* (Castillejo y Pelaz, 2008).

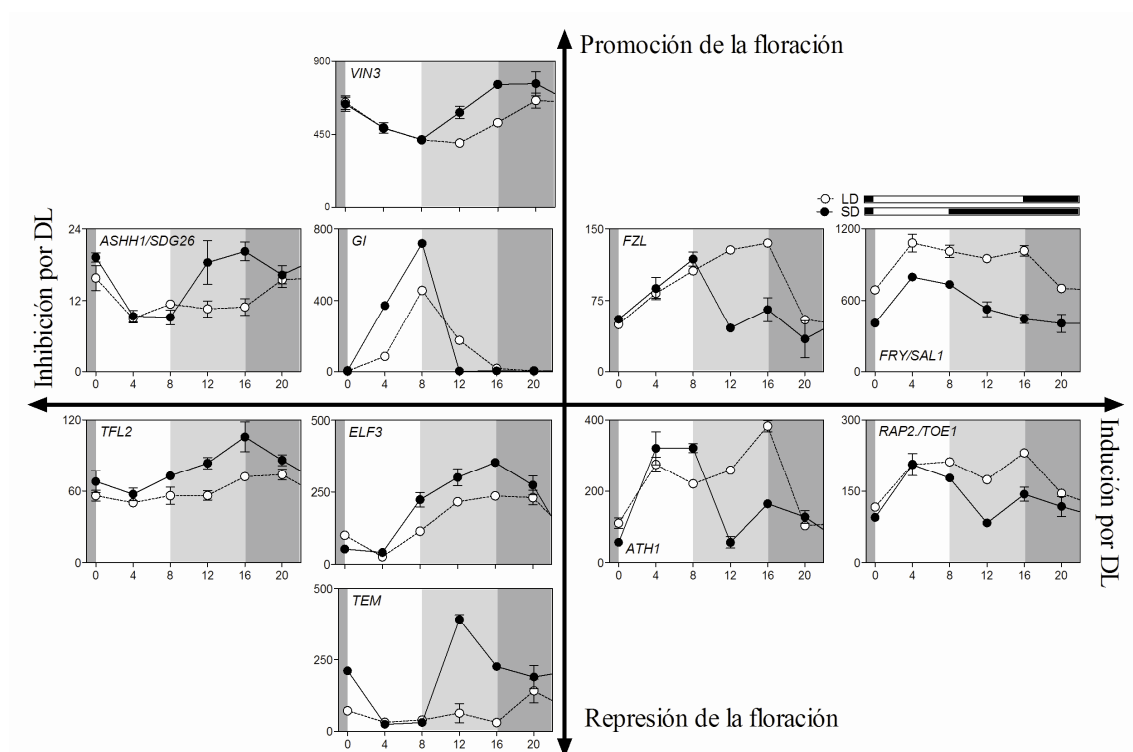


Figura 3.1: Ordenamiento de genes según tipo de respuesta a los días largos (Inhibición o Inducción de la expresión) y efecto sobre la floración (promoción o represión). Los gráficos muestran la expresión de los genes en función de las horas del día para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) o días largos (símbolos blancos). El gris tenue denota los momentos de la noche en los días cortos, el gris

oscuro son los momentos de noche para ambos grupos de plantas. Todos los genes presentan diferencias estadísticas en su expresión con un $p < 0.05$.

Si bien los patrones hasta aquí descriptos parecen lógicos y esperables, también encontramos genes que se apartan de este patrón. Por ejemplo, genes promotores de la floración que son inhibidos por los DL como *GI*, *SET DOMAIN GROUP 26* (*SDG26*)/*ASH1-RELATED PROTEIN 1* (*ASHH1*) y *VIN3* o genes que reprimen la floración son inducidos por los DL como *RELATED TO AP2.7* (*RAP2.7*)/*TOE1* y *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX GENE 1* (*ATH1*). *SDG26* es una histona metiltransferasa que inhibe la expresión de *FLC* y otros represores de la floración MADS-box pero que no muestran efectos obvios en los niveles de metilación de esos genes (Xu *et al.*, 2008). *VIN3* es una proteína “homedomain finger-containing” requerida para la represión de *FLC* en la vernalización y está asociada a cambios en la cromatina de *FLC* (Sung y Amasino, 2004). *TOE1* codifica un factor de transcripción represor de *APETALA2* (*AP2*) regulado por el *miRNA172* (Aukerman y Sakai, 2003). *TOE1* regula negativamente la expresión de *FT* y *CO* (Jung *et al.*, 2007). *ATH1* es un factor de transcripción que reprime la floración activando la expresión de *FLC* (Proveniers, 2007). Estos resultados nos llevan al concepto que la floración es la consecuencia de un balance de fuerzas positivas (promotoras de la floración) y negativas (represoras de la floración). Ambas fuerzas podrían ser necesarias para que el control fotoperiódico de la floración sea preciso, ambas fuerzas se hacen presentes cuando los días son largos. Según esta idea, la regulación precisa de la floración requeriría la promoción que ejercen las fuerzas positivas y el freno que imponen las fuerzas negativas. En resumen, además de favorecer la coincidencia entre la expresión

de *CO* y la luz causando la estabilidad de *CO* y consecuente expresión de *FT*, los DL también reducen la expresión de genes que retrasan la floración y promueve la expresión de genes que aceleran la floración, potenciando así la respuesta a la floración. Los DL también incrementan la expresión de genes que retrasan la floración y reducen la expresión de genes que aceleran la floración, contrarestando la respuesta fotoperiódica. Algunos genes controlados fotoperiódicamente actúan directamente sobre *FT*, otros podría actuar “*upstream*” *FT* y en otros caso la conexión con el control de la floración todavía debe ser estudiado.

B. Respuesta fisiológica de floración a fotoperíodos inductores.

Con el fin de conocer el significado funcional de los cambios transcripcionales en respuesta al número de ciclos inductores de la floración, debimos asegurarnos que dicho estudio fuese realizado en un rango en que el proceso fisiológico (floración) respondiese de manera gradual al aumento de ciclos inductores. Realizamos experimentos preliminares hasta poner a punto un protocolo en que el tiempo a floración (medido en número de hojas) muestra una respuesta gradual al número de ciclos inductores (DL) (Fig.3.2). Plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en DC, a los 24 d comenzaron a recibir ciclos inductores y retornaban luego a las condiciones no inductoras de DC. Un grupo de plantas permaneció en DC (0 ciclos inductores) como control y el tiempo a floración de estas plantas fue máximo (52 hojas). Cuando las plantas recibieron un ciclo inductor aceleraron su floración (11.5 hojas, comparado con el control). Al recibir dos ciclos inductores aceleraron aún más su floración (22.2 hojas, comparado con el control) y así hasta saturar la respuesta con tres ciclos inductores. Luego, el aumento en el número de ciclos (4, 5, 6 o 7) no adelantó más la floración de una manera significativa en comparación al grupo de plantas con dos ciclos inductores.

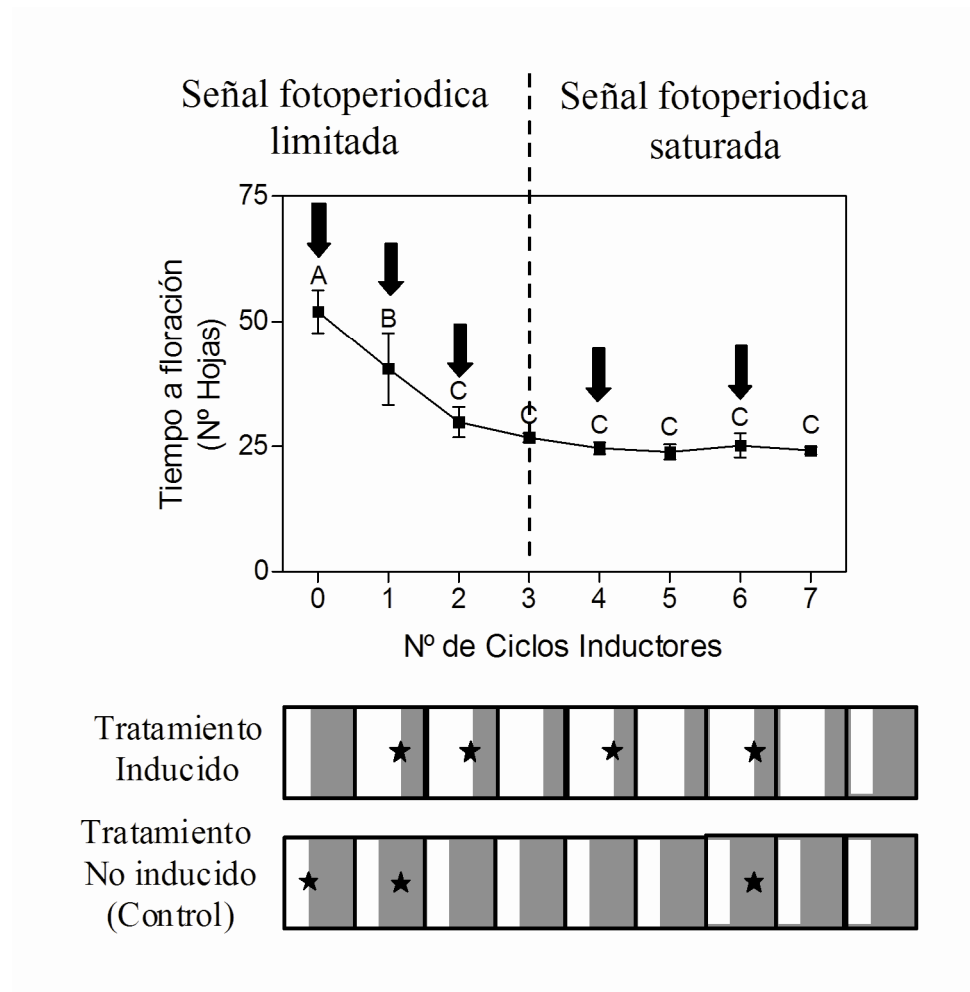


Figura 3.2: Respuesta fisiológica del tiempo a floración en función del número de ciclos inductores para plantas creciendo en días cortos. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos de plantas. Las flechas negras en el gráfico y estrellas negras en el esquema indican los días en los que se cosechó muestra vegetal para extracción de ARN. Para todos los casos correspondía a las 16 hs de comenzado el día, excepto la primer muestra en común entre ambos tratamientos que fue tomada a las 8 h del día.

En el Figura 3.2 podemos diferenciar dos zonas: la primera esta conformada por 0, 1, 2 y 3 ciclos inductores donde la señal fotoperiódica es limitante y se observa una respuesta del tiempo a floración a los fotoperíodos largos (letras diferentes). A

diferencia de ésta, en la segunda zona (4, 5, 6 y 7 ciclos inductores), la señal fotoperiódica esta saturante y no hay más respuesta de la floración. La toma de muestras vegetales para extracciones de ARN y análisis de microarrays se realizaron en los momentos que indica la Figura 3.2. Se tomaron dos muestras distintas en la zona limitante de señal fotoperiódica (1 y 2 ciclos inductores) y dos muestras distintas en la zona saturante (4 y 6 ciclos inductores). Como control tomamos ARN al día 0 (8 h), 1 y 6 de plantas que nunca fueron inducidas (DC).

Conociendo estos resultados podemos plantearnos dos modelos diferentes de integración temporal de fotoperíodos inductores para florecer: 1-“*Modelo de acumulación de señal en las hojas*”, para el cual un transcripto se acumularía en las hojas con los DL y aceleraría la floración en función del nivel de expresión alcanzado; o 2- “*Modelo de persistencia de la señal en hojas*”, para el cual se necesitaría que un transcripto funcione como una señal que (dentro de cierto rango) cuanto más persista más acelera el tiempo a floración. A continuación, en los siguientes resultados, buscaremos genes candidatos para los modelos presentados y discutiremos su mecanismo de funcionamiento.

C. Respuesta transcripcional de los genes de floración a fotoperíodos inductores.

A pesar de que el análisis de microarrays es una fuente de información para muchos procesos regulados por el fotoperíodo, en este capítulo sólo nos concentraremos en aquellos genes que están relacionados con la floración y más adelante extenderemos el análisis a otros procesos. Para eso continuamos trabajando con la misma lista de 65 genes funcionalmente relacionados al tiempo a floración confeccionada en TAIR (Tabla S.1 del APÉNDICE), de los cuáles, en nuestro experimento, sólo 36 mostraron un

efecto significativo del fotoperíodo ($p < 0.037$ y $q < 0.01$). Comparamos las respuestas transcripcionales a ciclos inductores con la expresión de los mismos 65 genes en plantas creciendo siempre en DL o DC del experimento de Micheal *et al.* (2008). Ambos experimentos presentaban grandes diferencias de protocolo: Micheal *et al.* (2008) cultivaron plantas con fondo genético *Lansberg Erecta* (Ler) en placas de Pettri con medio rico en sacarosa mientras que nosotros cultivamos Col0 en macetas con sustrato sólido (ver CAPÍTULO 2.A.). La Figura 3.3 muestra las relaciones de expresión entre plantas expuestas a ciclos inductores y controles en DC (a: 1DL/DC; b: 2DL/DC; c: 4DL/DC y d: 6DL/DC) en función de las relaciones de expresión entre plantas cultivadas siempre en DL y sus controles en DC (DL/DC). A modo de referencia se incluye la línea 1:1 para cada gráfico, ésta nos indica que los puntos colocados sobre ella tienen igual magnitud de cambio relativo en ambos experimentos. Examinando las figuras podemos advertir que ya desde el primer ciclo inductor (Fig.3.3-a) la mayoría de los genes se posan sobre la línea 1:1 y esto se mantiene a lo largo del resto de los ciclos inductores. Estos resultados tienen una gran robustez debido a la reproductibilidad que tuvo la expresión génica a pesar de crecer en dos sistemas diferentes como antes mencionamos, sugiriéndonos que las expresiones genéticas en plantas creciendo siempre en DL se alcanzan con un sólo ciclo inductor en plantas creciendo en DC. Analizando en detalle los gráficos vemos en cada uno, dos genes con un comportamiento particular, uno de ellos es *FT* y el otro *GI*. *FT* creciendo siempre en DL aumenta casi 2 veces su expresión en comparación con los DC, en cambio cuando recibe un ciclo inductor creciendo en DC aumenta 10 veces su expresión. Estos resultados sugieren que la sensibilidad de *FT* al DL es mayor si las plantas previamente estaban en fotoperíodos cortos. Alternativamente, las diferencias podrían deberse a la

comparación de distintos sistemas experimentales. Este elevado nivel de *FT* se mantuvo en los sucesivos ciclos inductores (Fig.3.3-b, -c y -d).

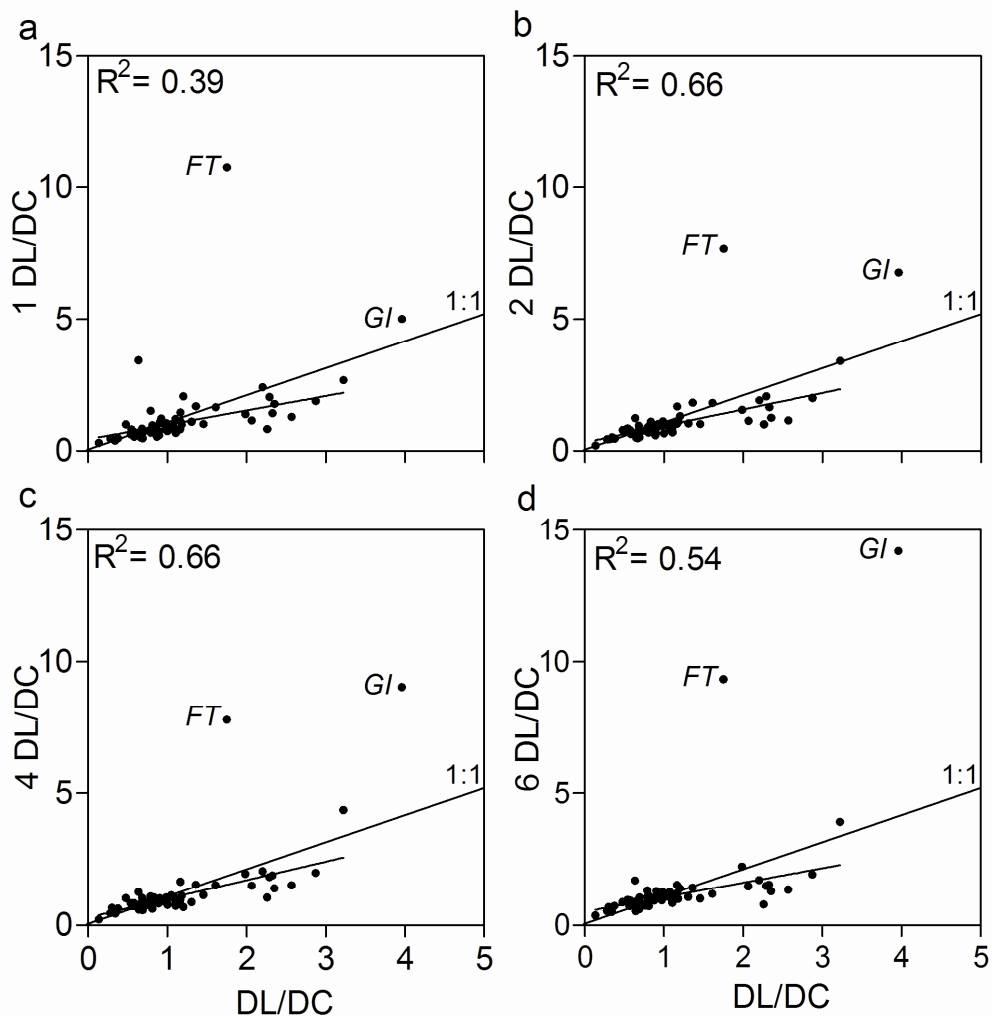


Figura 3.3: Correlación entre el cociente de expresión génica en plantas creciendo siempre en días largos o días cortos (DL/DC) y el cociente de expresión génica en plantas transferidas de días cortos al número indicado de ciclos inductores: **a**- 1, **b**- 2, **c**- 4 y **d**- 6. Los puntos corresponden a 65 genes relacionados a floración según TAIR. Se destacan a los genes *FT* y *GI*. La línea 1:1 se incluye como referencia. La expresión corresponde a la hora 16 desde el comienzo del día.

También encontramos una conducta particular para el gen *GI*. Frente a un ciclo inductor (Fig.3.3-a) *GI* responde de manera similar a aquellas plantas creciendo siempre en DL (aproximadamente 4.5 veces más que en DC para ambas situaciones) pero a medida que aumentan los ciclos inductores la expresión genética aumenta mucho más que en plantas creciendo siempre en DL (en las Figuras 3.3-b, -c y -d) alcanzando en el sexto día inductor (Fig.3.3-d) una diferencia de expresión de 14 veces en relación al DC. Sugiriendo que la sensibilidad del gen *GI* a los ciclos inductores iría aumentando a medida que pasan los mismos.

Si las plantas integrasen la señal fotoperiódica siguiendo el *Modelo de acumulación de la señal en hoja* entonces tendría que haber transcritos con un nivel de expresión que acompañe el aceleramiento de la floración con los ciclos inductivos. Evaluamos la correlación entre la expresión genética y el tiempo a floración de estos genes y la Tabla 3.I muestra los genes que tuvieron un valor p significativo ($p < 0.05$). Observamos que *GI* tuvo una correlación de -0.89. Esta correlación ocurre porque la expresión de *GI* a las 16 h (Fig.3.4-a) se mantiene baja y estable para plantas creciendo en DC, en cambio para plantas que están en DL aumenta gradualmente con el aumento de los ciclos inductores.

Tabla 3.1: Coeficiente de correlación (r), coeficiente de regresión (R^2) y valor- p asociado entre la expresión genética y el tiempo a floración para diferentes genes vinculados al proceso de floración. Se muestran solamente los genes significativos ($p < 0.05$), en la Tabla S.1 del APÉNDICE se encuentra la lista completa.

Gen	r	R ²	Valor p del r	Descripción
AT2G40080	-0.99	0.97	0.00026	ELF4
AT4G38680	0.97	0.93	0.00090	CSDP2/GRP2
AT5G17690	0.95	0.90	0.00168	TFL2
AT2G46340	-0.93	0.87	0.00257	SPA1
AT4G32980	-0.92	0.84	0.00360	ATH1
AT3G51780	-0.90	0.81	0.00472	ATBAG4
AT1G22770	-0.89	0.78	0.00551	GI
AT1G03160	-0.87	0.76	0.00650	FZL
AT3G26640	0.87	0.75	0.00688	WD-40
AT5G48300	-0.86	0.74	0.00729	ADG1
AT1G25560	0.84	0.70	0.00927	AP2
AT1G27650	0.80	0.64	0.01198	ATU2AF35A
AT1G04870	0.80	0.64	0.01227	Protein arginine N-methyltransferase family protein
AT5G42820	0.78	0.61	0.01382	ATU2AF35B
AT1G18450	0.74	0.55	0.01722	ATARP4
AT4G30200	0.72	0.51	0.01966	VIN3
AT1G65480	-0.66	0.43	0.02533	FT
AT2G02560	-0.64	0.41	0.02652	CAND1
AT2G44950	-0.60	0.36	0.03085	HUB1
AT1G60220	0.59	0.35	0.03131	cysteine-type peptidase
AT1G12910	-0.59	0.35	0.03165	ATAN11
AT2G42200	0.59	0.35	0.03172	SPL9
AT4G04920	-0.56	0.35	0.03203	similar to hypothetical protein OsI_033047
AT1G64990	0.55	0.31	0.03533	
AT1G31814	0.53	0.30	0.03579	FRL2
AT4G40060	0.53	0.28	0.03788	ATHB-16/ATHB16
AT3G07650	0.53	0.28	0.03788	COL9
AT4G02440	-0.52	0.28	0.03803	EID1
AT5G63980	-0.51	0.27	0.03851	SAL1
AT5G02030	-0.50	0.26	0.03972	LSN
AT2G22360	-0.49	0.25	0.04095	DNAJ heat shock family protein
AT2G32950	0.49	0.24	0.04164	COP1
AT1G01040	0.45	0.24	0.04215	DCL1
AT2G25930	0.45	0.21	0.04573	ELF3
AT5G64930	0.44	0.20	0.04653	CPR5
AT5G37770	0.43	0.19	0.04739	TCH2
AT5G04240	-0.42	0.18	0.04842	ELF6
AT1G77080	-0.41	0.18	0.04932	MAF1

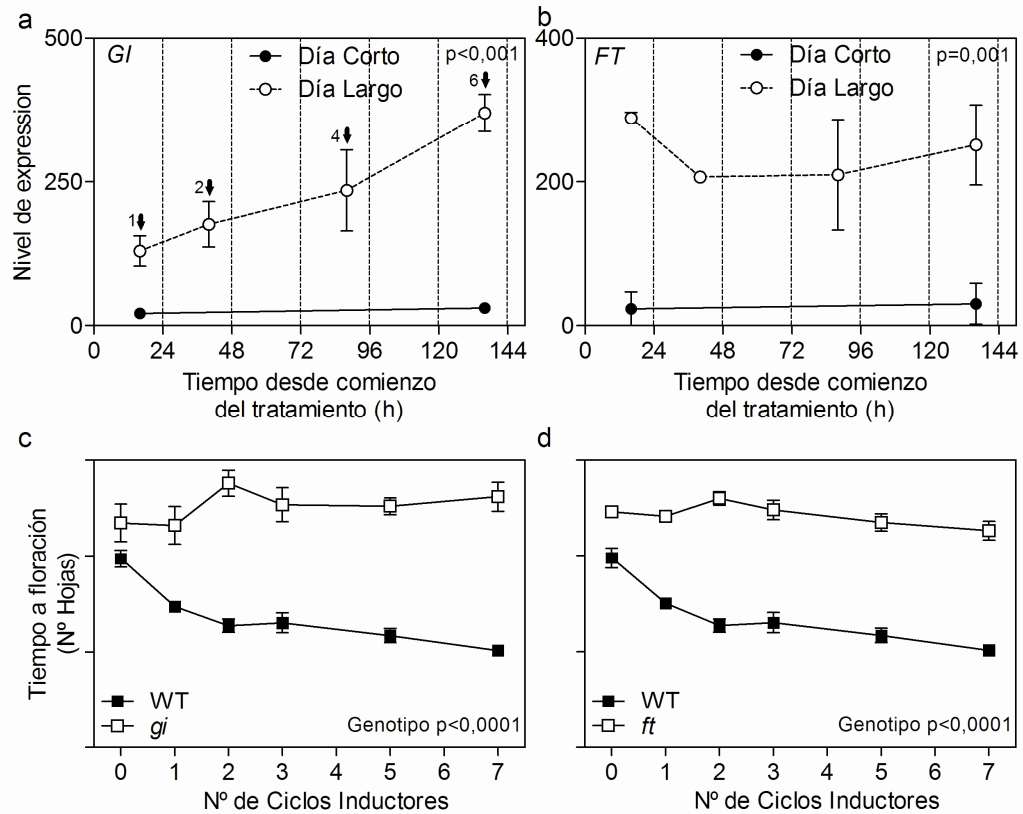


Figura 3.4: *a-* y *b-*; Expresión genética de *GI* y *FT* para plantas creciendo en días cortos y plantas inducidas. Las flechas negras indican el número de ciclo al que corresponde el punto. Tiempo a floración en función de los ciclos inductores en plantas WT y mutantes *c-gi* y *d-ft*⁽¹⁾.

Para corroborar la funcionalidad de *GI* en nuestras condiciones experimentales, estudiamos la respuesta del tiempo a floración para plantas de genotipo salvaje WT y plantas *gi-2* que son mutantes nulas del gen *GI* (David *et al.*, 2006) (Fig.3.4-c). Podemos observar que la respuesta gradual de las plantas WT a los ciclos inductores desaparece en las plantas *gi-2*, confirmando que este gen es necesario para la detección del número de ciclos inductores.

⁽¹⁾ La evaluación del mutante *ft* corresponde al trabajo en conjunto con el Lic. Biol. Martín Krzymusky, becario doctoral del Dr. Casal.

En principio, las observaciones descriptas son consistentes con la ocurrencia de un mecanismo de integración del número de ciclos inductores basado en el paulatino aumento de la expresión de *GI* con el correr de los ciclos inductores y una consecuente aceleración gradual de la floración (WT en Fig.3.4-c), teniendo en cuenta que *GI* es un conocido promotor de la floración (Huq *et al.*, 2000). Sin embargo, este argumento tiene cierta debilidad. En el experimento de microarreglos tomamos muestras a la hora 16 desde comenzado el día y en ese momento la expresión de *GI* es mínima. En realidad, la integral diaria de expresión de *GI* es menor en DL que en DC, ya que la expresión en DL únicamente supera a los DC entre las 12 y 16 h (Micheal *et al.*, 2008) (Fig.3.6).

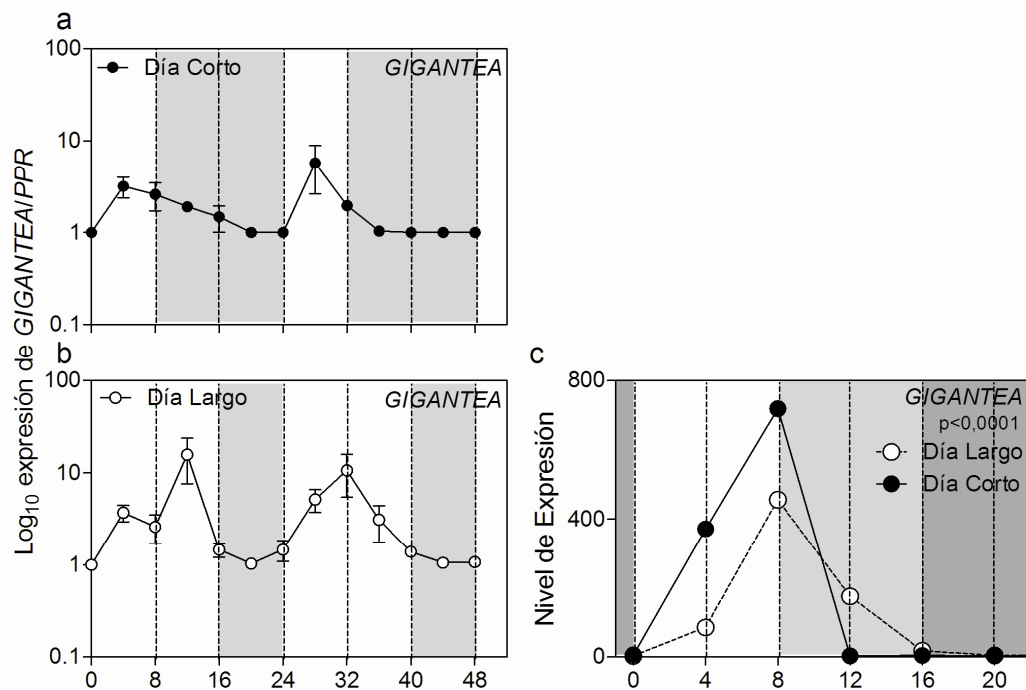


Figura 3.5: Patrones diarios de expresión genética de *GI* medidos por q-PCR para plantas WT creciendo en DC (a- y b-). c- Expresión genética en función de las horas del día para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) o días largos (símbolos blancos).

La Figura 3.5-a nos muestra que *GI* presenta un ciclo diario de expresión, regulado por el reloj (Millar y Kay, 1996), con un pico de expresión promediando la mitad de las 8 h de luz (4 h aproximadamente), similar a los datos de expresión por microarrays de la Figura 3.5-c basada en datos publicados (Micheal *et al.*, 2008). Cuando las plantas reciben el primer ciclo inductor (Fig.3.5-b), *GI* alcanza un pico máximo cerca de las 12 h. Al recibir el segundo ciclo inductor el valor máximo se mantiene como el día anterior. Si bien la marcha de los niveles de expresión de *GI* no es exactamente igual el primer y segundo DL, no se observa un aumento generalizado de la expresión de *GI* durante el segundo día como si se ve en la Figura 3.4-a. Estos resultados refutan el *Modelo de acumulación de la señal en hoja* basado en *GI*. Si bien los microarreglos nos mostraban un aumento gradual de la expresión de *GI*, los resultados de q-PCR nos indican que los cambios producidos en la hora 16 son mínimos a los cambios que suceden a lo largo del día. Un punto no menor es que se considera que *GI* actúa vía *FT*, pues regula su expresión (Mizoguchi *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007; Sawa y Kay, 2011) y en nuestras condiciones la expresión de *FT* no aumenta con el número de ciclos (Fig.3.4-b). En efecto, *FT* tiene una expresión mínima que se mantiene estable para plantas creciendo en DC, cuando las plantas son transferidas a DL aumenta la expresión de *FT*, durante el primer ciclo inductor y se mantiene estable en los sucesivos hasta el día 6. Al igual que *gi-2*, plantas *ft* (mutantes nulos del gen *FT*) pierden totalmente la sensibilidad fotoperiódica (Fig.3.4-d) confirmando la importancia de éste gen en el proceso fisiológico en cuestión. Los patrones de expresión de *FT* son consistentes con el modelo alternativo, el “*Modelo de persistencia de la señal en hojas*” (Fig.3.4-b). Para este caso la expresión diferencial de *FT* funcionaría como una señal que debe permanecer ininterrumpidamente para acelerar la floración. Cuanto más días permanezca la señal (dentro del rango de sensibilidad) menor será el tiempo a floración.

D. La vía autónoma condiciona a la respuesta fotoperiódica.

FT es el “florigén” de las plantas, el gen que desencadena la floración (Zeevaart, 2006). Su nivel de expresión es el resultado de la integración de todas las vías de floración de la planta (Fig.1.5): la vía fotoperiódica, la vía de la vernalización, la vía de las temperaturas ambientales, la vía de la edad de la planta, la vía de las giberelinas y la vía autónoma. Ésta última se refiere a un mecanismo de floración constitutivo que poseen las plantas que garantiza la ocurrencia de la floración a pesar de no haber recibido un estímulo fotoperiódico. Tradicionalmente se ha considerado a la vía fotoperiódica como independiente de la vía autónoma, debido a que mutantes de genes asociados a la vía autónoma no tienen alteradas las respuestas fotoperiódicas (Scortecci *et al.*, 2003). Si la señal fotoperiódica es suficiente, las plantas florecen a través de esa vía, en cambio si la señal nunca aparece las plantas utilizan la vía autónoma. No obstante, si la señal fotoperiódica aparece de forma limitante (Fig.3.2) la floración se dará seguramente por la vía fotoperiódica pero cabe preguntarse si la vía autónoma condiciona de alguna manera a la vía fotoperiódica cuando esta recibe una señal limitada. Tomamos plantas mutantes nulas de genes de la vía autónoma y evaluamos su comportamiento frente al protocolo de los ciclos inductores y observamos si interferían en el proceso de integración de señales fotoperiódicas. Los genes evaluados fueron: *FLC*, *TFL1*, *SVP* y *PCFS4*. En la Figura 3.6-a vemos que el mutante *flc* adelantó la floración (3 hojas, comparado con el WT) cuando las plantas crecían en DC (0 Ciclos inductores) pero respondió normalmente al estímulo fotoperiódico. Es decir, el adelanto en la floración se mantuvo a lo largo de todos los ciclos inductores denotando un arrastre en el efecto ya detectado en plantas cultivadas en DC. Las diferencias entre los genotipos fueron significativas ($p < 0,001$). El efecto de los diferentes ciclos inductores

impactó en igual magnitud para ambos genotipos por lo tanto no hubo interacción entre éstos dos factores ($p=0,88$). De igual manera que en el caso anterior, para el mutante *tfl1* observamos un adelanto en la floración (19 hojas menos que el WT) en DC y una respuesta gradual a los progresivos ciclos de DL (Fig.3.6-b). La aceleración del tiempo a floración debido al efecto del genotipo ($p<0,0001$) se mantuvo en todos los ciclos inductores sin haber interacción significativa entre ambos tratamientos ($p=0,0915$).

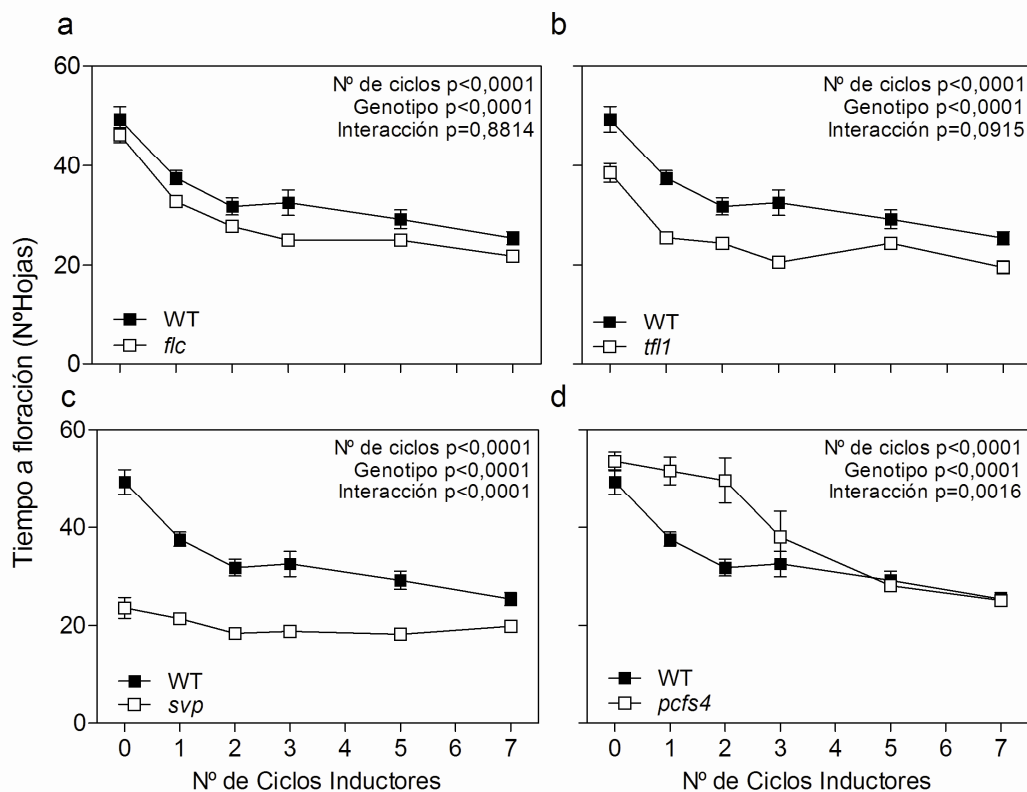


Figura 3.6: Tiempo a floración medido en número de hojas en función del número de ciclos inductores (días largos) para los mutantes **a-*flc***, **b-*tfl1***, **c-*svp*** y **d-*pcfs4***. Todos los mutantes son comparados al WT (genotipo salvaje). En cada gráfico se muestra los valores p obtenidos luego del análisis estadístico para el número de ciclos, el genotipo y la interacción del Nº de ciclos con el genotipo⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Los datos corresponden a experimentos realizados en colaboración con Santiago García Chafuén e integran su tesina para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Junto al Dr. Casal integramos su comité consejero.

El gen *SVP* es un inhibidor de la floración (Hartmann *et al.*, 2000), los mutantes *svp* adelantaron la floración tanto en DC (26 hojas, comparado con el WT) como en DL (6 hojas, comparado con el WT) pero la respuesta al número de ciclos inductores no fue similar al WT, consecuentemente la interacción entre ambos tratamientos (nº de ciclos inductores y genotipo) fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (Fig.3.6-c). La respuesta del mutante *svp* muestra muy baja sensibilidad (el cambio en el número de hojas a floración entre un tratamiento y otro), es decir, una mínima respuesta a lo largo de los fotoperíodos largos. La sensibilidad de *svp* a los ciclos inductivos fue menor que para WT, alcanzó un mismo punto de saturación (número de ciclo por encima del cuál no hay reducción en el tiempo a floración) aunque con tiempos a floración diferentes (13 hojas, comparado con WT).

El mutante para el gen *PCFS4* mostró un patrón de respuesta que difiere notablemente de los anteriores y del WT. Se observa en la Figura 3.6-d que *pcfs4* retrasó la floración y que durante los primeros 2 ciclos de DL no hay cambios en el tiempo a floración, por lo que se va ampliando la diferencia con el WT (4, 13 y 18 hojas de diferencia para el 0, 1 y 2 ciclos inductores respectivamente). A partir de 3 ciclos inductivos hay una reacción ante la señal fotoperiódica que progresivamente se ajusta en tiempo (numero de hojas) y sensibilidad (pendiente) a la respuesta de WT. Como resultado del análisis estadístico encontramos una interacción significativa entre ambos tratamientos ($p = 0.0016$).

Con el aumento de la señal fotoperiódica por un mayor número de ciclos inductores se observa un incremento gradual del peso de la vía fotoperiódica y una dilución del peso de la vía autónoma. Sin embargo, los genes *SVP* y *PCFS4* clasificados como “genes de vía autónoma” interactúan también con las respuestas al fotoperiodo. Exponer plantas mutantes a una serie de ciclos inductores (y no sólo a DC y DL

permanentes) permitió detectar dicha interacción. Existen mecanismos que vinculan a *SVP* y *PCFS4* con *FT*, que a su vez es importante para la respuesta fotoperiódica. Estas vías podrían explicar las interacciones que aquí se describen.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE II)

EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DE LA DEFENSA DE LAS PLANTAS

A. Otros procesos regulados por el fotoperíodo: La señalización del ácido jasmónico

Además de la floración, otros procesos se ven afectados por los DL. Nuestros datos de expresión global de genes obtenidos mediante la utilización de microarrays ofrecen información útil de respuesta a DL más allá de los 65 genes relacionados al proceso de floración según TAIR. Los chips de Affimetrix contienen aproximadamente 24000 genes de los que seleccionamos 7096 genes por respuesta significativa a DL a través de un ANOVA ($p < 0.05$ y $q < 0.012$). Este grupo de genes significativos podrían contener información acerca de estos otros procesos regulados por el fotoperíodo que resultan de gran interés conocer.

La agrupación por patrones de expresión generó 20 clusters (Fig.4.1). Estos grupos incluyen genes para los que la expresión en DL es menor que en DC (clusters 1, 3, 4, 5, 6, 7, 17 y 18) y genes cuya expresión en DL es mayor que en DC (clusters 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19 y 20).

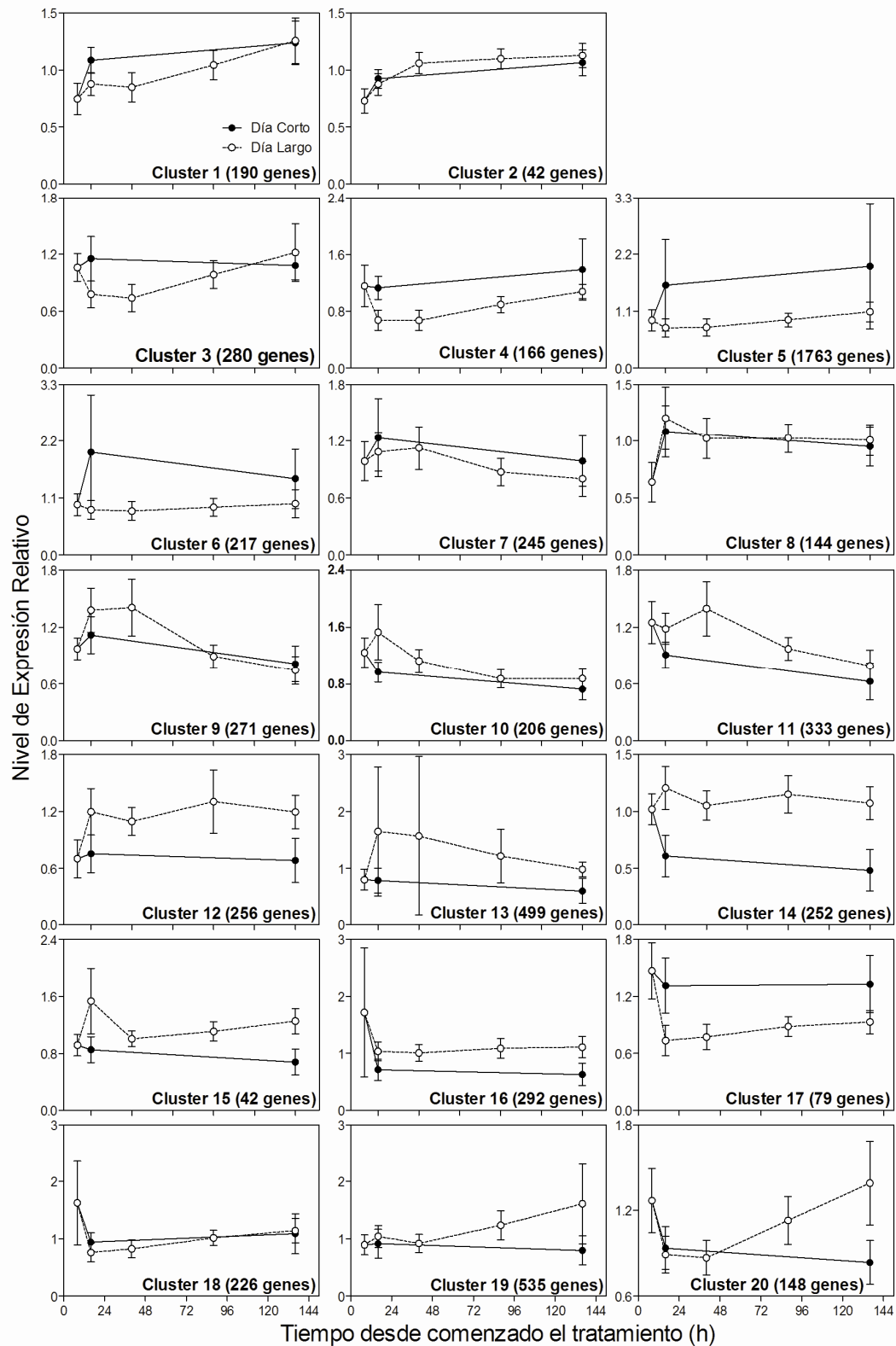


Figura 4.1: Clusters de expresión genética en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros). Los clusters se construyeron con ayuda del programa D-Chip utilizando los 7096 genes

seleccionados después del ANOVA. Entre paréntesis figura el número de genes que componen cada cluster.

Tabla 4.I.: Funciones sobre-representadas por los genes que componen cada cluster, con su valor *p* correspondiente. El análisis se realizó con la plataforma ATCOECIS.

Esta es una tabla resumen, la información completa se encuentra en la Tabla S.2 del APÉNDICE.

	Función o Proceso (GO terms)	valor-p
Cluster 1	Biosíntesis de coenzimas	5.54E-04
	Biosíntesis de hormonas	3.89E-02
Cluster 2	Activación de coenzimas	1.43E-04
	Respuesta de defensa	2.61E-01
Cluster 3	Respuesta a estímulos de etileno	5.81E-05
	Señalización mediada por el ácido jasmónico	2.98E-02
	Regulación positiva del desarrollo	4.08E-02
Cluster 4	Actividad en canal de iones	3.13E-05
	Transporte polar de auxinas	2.33E-02
Cluster 5	Tropismo	8.81E-07
	Diferenciación de tricoblastos	1.88E-02
Cluster 6	Morfogénesis celular	9.82E-05
	Actividad oxidoreductasa	4.36E-02
Cluster 7	Estructura del ribosoma	9.14E-12
	Metabolismo de auxinas	5.65E-02
Cluster 8	Metabolismo de nicotinamidas	7.52E-04
	Señalización mediada por el ácido abscísico	3.74E-02
Cluster 9	Estructura del ribosoma	5.36E-156
	Proliferación celular	5.16E-02
Cluster 10	Actividad helicasa dependiente del ATP	9.78E-06
	Pérdida de pared celular	2.67E-02
Cluster 11	Replicación de ADN	1.05E-12
	Meiosis I	1.75E-02
Cluster 12	Actividad oxidoreductasa	1.10E-07
	Actividad feniltransferasa	3.13E-02
Cluster 13	Biosíntesis de derivados de aminoácidos	1.43E-10
	Respuestas a UV-B	8.51E-03
Cluster 14	Membrana interna del cloroplasto	7.02E-07
	Señalización mediada por el ácido jasmónico	1.86E-03
	Inhibidos de la actividad endopeptidasa	2.68E-02
Cluster 15	Actividad liasa carbono-oxígeno	1.39E-02
	Transporte de iones	1.33E-01
Cluster 16	Membrana tilacoide	2.80E-12
	Metabolismo de carotenoides	3.27E-02
Cluster 17	Organización y biogénesis del citoesqueleto	2.12E-03

	Microtúbulos del citoesqueleto	4.94E-02
Cluster 18	Fotosistemas	1.84E-09
	Actividad transportadora de iones	3.82E-02
Cluster 19	Actividad ATPasa, mecanismo fosforilativo	1.66E-05
	Actividad transportadora del ión potasio	6.10E-02
Cluster 20	Transportación de aminos	3.14E-04
	Señalización mediada por el ácido jasmónico	9.29E-03
	Metabolismo de glicoproteínas	3.93E-02

Cada uno de estos clusters está conformado por entre 42 y 1763 genes. Utilizando la plataforma ATCOECIS (Vandepoele *et al.*, 2009) buscamos para cada cluster las funciones sobre-representadas. Los resultados están resumidos en la Tabla 4.I. con las principales funciones que se desprenden del análisis (la lista completa se presenta en la Tabla S.2 del APÉNDICE). Es interesante notar que en tres clusters (3, 14 y 20) aparece sobre-representada la función de “Señalización mediada por el ácido jasmónico (JA)”. Los JA son oxilipinas que juegan un rol importante en la activación de la defensa de plantas a ataques de herbívoros y organismos patógenos (Browse, 2009; Chung *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009; Howe, 2010; Ballaré, 2011). Nos ayudamos de una lista confeccionada por Goda *et al.* (2008) de 759 genes regulados por JA indicando si son promovidos o inhibidos por esta hormona (Tabla S.3 del APÉNDICE). La expresión génica de 467 de esos genes fue afectada significativamente por los DL. En la Figura 4.2-a y -b podemos ver el patrón de expresión de genes promovidos y de genes inhibidos por JA respectivamente. Observamos que aquellos genes que se promueven con la presencia de JA también tienden a ser promovidos por los DL y los genes que se inhiben con JA tienden a ser inhibidos por los DL. Estos resultados nos permiten interpretar que en DL se eleva el nivel de señalización por JA.

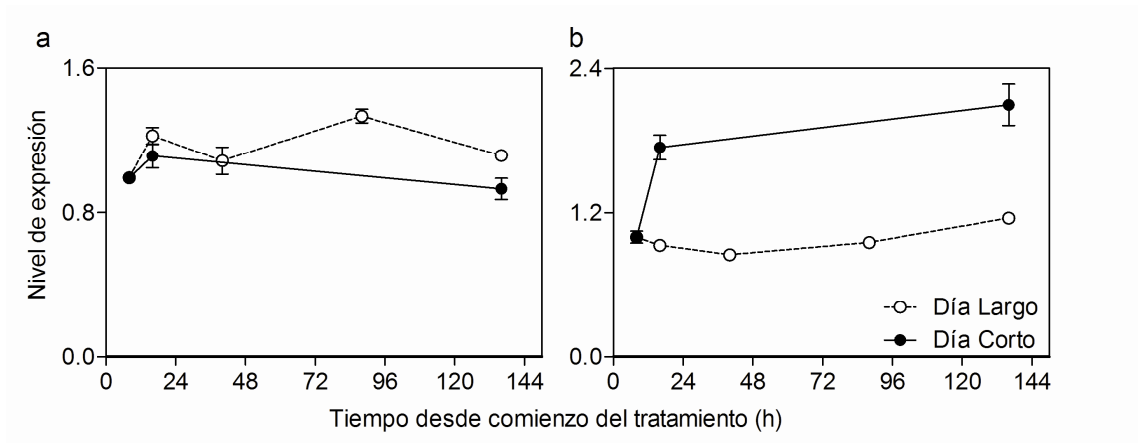


Figura 4.2: Patrón general de expresión de **a-** genes promovidos por JA (318 genes) y **b-** genes inhibidos por JA (149 genes) en función del tiempo desde comienzo de los tratamientos para plantas creciendo en días cortos (símbolos negros) y plantas inducidas con días largos (símbolos blancos).

B. Vías de interacción entre el fotoperíodo y JA a través de expresión de genes.

La plataforma ATCOECIS propone una lista de 27 genes (Tabla S.4 del APÉNDICE) involucrados en la “Señalización mediada por JA”, 13 de ellos mostraron efectos significativos ($p < 0.05$) del tratamiento fotoperiódico (Fig.4.3).

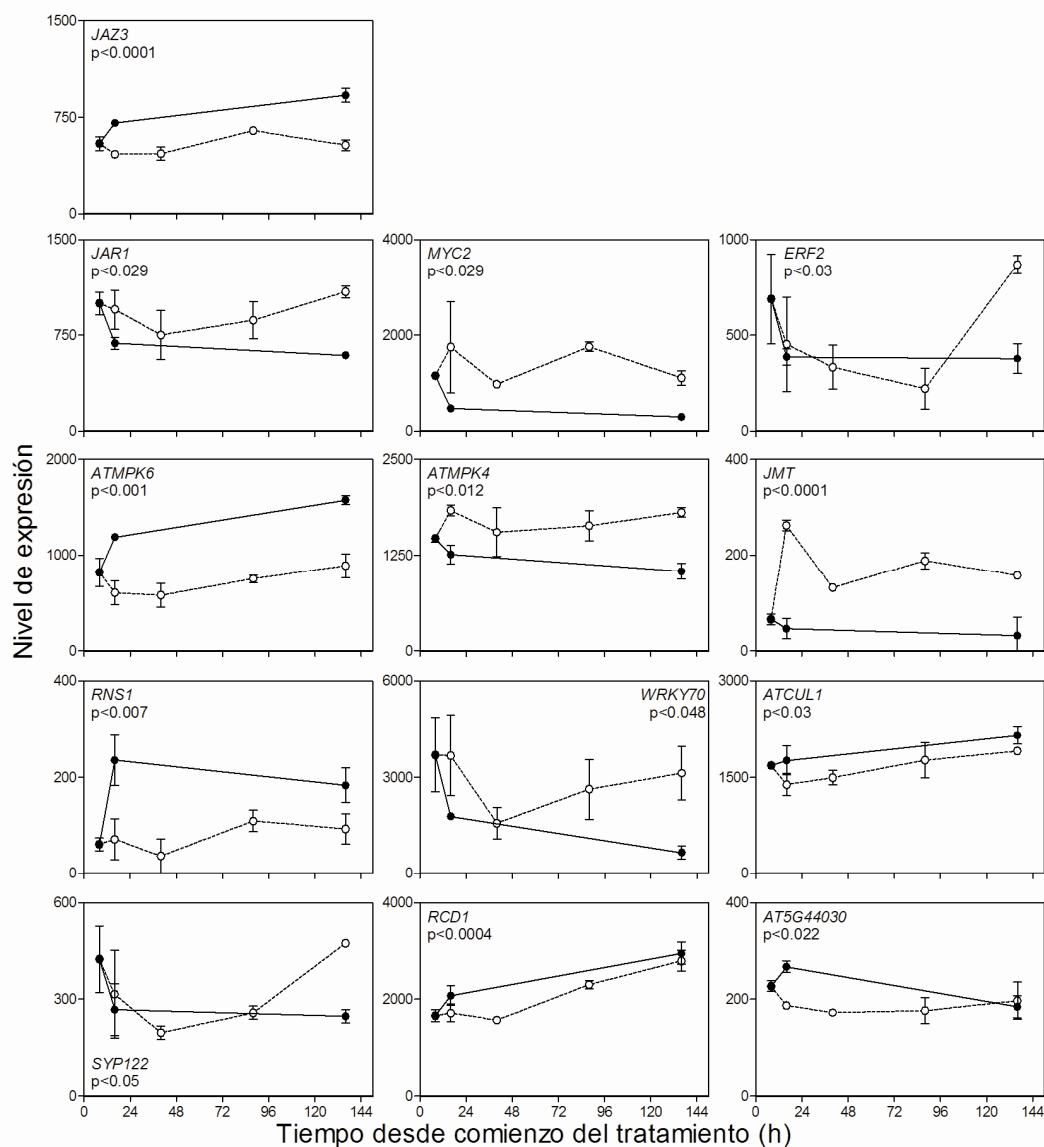


Figura 4.3: Expresión de los genes involucrados en la señalización mediada por ácido jasmónico (ATCOECIS) en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros).

La percepción del jasmonoyl-iso-leucine (JA-Ile), el aminoácido conjugado bioactivo del JA, lo realiza la ubiquitin ligasa SCF^{COI}. Cuando la proteína F-box CORONATIVE-INSENSITIVE1 (COI1) reconoce a JA-Ile se dispara la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de la proteína JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) que

reprime la expresión de genes de respuesta al JA (Ballaré, 2011). La Figura 4.3 muestra a *JAZ3* con una baja expresión en DL comparados con los DC. La conjugación de JA a su forma perceptible JA-Ile está catalizada por una enzima codificada por el gen *JASMONATE RESISTANCE 1 (JAR1)*, los transcritos de este gen aumentan en tejidos con heridas y su función es importante sólo en las primeras horas de haberse producido la lesión (Suza y Staswick, 2008). *JAR1* está envuelto en la señalización de rojo lejano (RL) mediada por phyA y es un supresor de COP1 (Hsieh *et al.*, 2000). En nuestros experimentos, los transcritos de *JAR1* se matienen altos con los DL (Fig.4.3). El JA también puede metilarse a metil-jasmónico (MeJA) que funciona como señal endógena de la defensa de las plantas, esta reacción es catalizada por la enzima S-adenosyl-L-methione:jasmonic acid carboxyl methyltransferase cuyo transcripto *JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE (JMT)* se acumula en tejidos dañados, la sobre-expresión causa incrementos de MeJA sin alterar el contenido de JA y aumenta la resistencia a la infección del hongo *Botrytis cinerea* (Turner *et al.*, 2002). La Figura 4.3 nos muestra que los niveles de *JMT* aumentan en DL hasta cuatro veces más en comparación al DC.

MYC2 es un factor de transcripción que contiene un dominio bHLH (Basic Helix-Loop-Helix), es uno de los principales componentes de la señalización de JA (Lorenzo y Solano, 2005) y actúa como activador o represor de la expresión de varios genes de respuesta al JA (Lorenzo *et al.*, 2004). *MYC2* es también conocido como *JASMONATE-INSENSITIVE1 (JIN1)*, *RD22BP1*, *RAP-1* o *ZBF1* (Berger *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 1997; De Pater *et al.*, 1997; Yadav *et al.*, 2005). Regula negativamente la expresión de los genes de respuesta al JA *PDF1.2*, *CHIB/PR3* y *HEL/PR4* que participan en la defensa contra ciertos patógenos (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). Consecuentemente, plantas mutantes *myc2* muestran un incremento en la

resistencia a patógenos como *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). El resultado de nuestro ensayo de microarrays muestra un incremento en los niveles de *MYC2* con los DL. El mutante *myc2* también presenta altos niveles de transcritos de *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2 (ERF2)* que codifica para un regulador positivo de genes de defensa dependientes de JA y su sobreexpresión causa incrementos en la resistencia a *Fusarium oxysporum* (McGrath *et al.*, 2005). En nuestros experimentos *ERF2* se comporta de manera similar en ambos fotoperíodos aunque a los 6 días del cambio fotoperiódico muestra un mayor nivel en DL en comparación con el DC.

El JA activa a Mitogen-Activated Protein Kinase 6 (MPK6) que es componente importante en la cadena de transducción de esta señal (Takahashi *et al.*, 2007) y el nivel de sus transcritos (*ATMPK6*) bajó en los DL (Fig.4.3). Del mismo modo la proteína MPK4 que actúa de represor de las defensas inducidas por etileno y JA (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006) mantiene elevado el nivel de transcritos en DL (*ATMPK4*, Fig.4.3).

Por último, algunos genes menores aumentaron con los DL: *WRKY70* y *SYNTAXIN OF PLANT 122 (SYP122)*. *WRKY70* es un componente de la señalización del JA actúa reprimiendo genes de respuesta a JA y se propone como un componente de la ruta metabólica del JA y el ácido Salicílico (SA) con efectos antagonistas (Li *et al.*, 2004). *SYP122* es un regulador negativo de las defensas de las plantas, *Arabidopsis* mutantes nulas *syp121* y *syp122* presentan una baja resistencia a la penetración del hongo que produce mildiu (Zhang *et al.*, 2008). Otros genes menores disminuyeron con los DL: *RIBONUCLEASE 1 (RNS1)*, *ATCUL1*, *RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 (RCD1)* y *AT5G44030*. El gen *RNS1* se expresa en tejidos dañados (Gfeller *et al.*, 2001). *ATCUL1* codifica para una proteína que compone al complejo SCF ubiquitin

ligasa que participa en las respuestas al JA (Gray *et al.*, 1999). *RCD1* cumple funciones en la respuesta a estreses abióticos (Teotia y Lamb, 2010). *AT5G44030* codifica para una enzima celulosa sintasa que participa en la biosíntesis de la pared secundaria que confiere mayor resistencia al ataque de patógenos (Kim *et al.*, 2012).

C. El fotoperíodo como regulador de la resistencia de las plantas al ataque de hongos patógenos.

Las funciones sobre-representadas en los clusters de expresión nos indican, que la señalización por JA está siendo alterada por los DL (Tabla 4.I) afectando algunos de los principales genes de esta ruta (Fig.4.3). A la vez, los genes promovidos por JA son promovidos por los DL y los genes inhibidos por JA son inhibidos en los DL (Fig.4.2) indicando que la señalización por JA es positivamente afectada por DL. Conociendo que JA actúa sobre la defensa de las plantas (Ballaré, 2011), podemos hipotetizar que la señal fotoperiódica de DL aumenta las defensas de las plantas haciéndolas menos susceptibles al ataque de patógenos a través de un incremento en las señales mediadas por JA.

Para poner a prueba esta hipótesis cultivamos plantas de *Arabidopsis* siguiendo el mismo protocolo de los ensayos anteriores y al momento del cambio fotoperiódico inoculamos ambos grupos de plantas (DC y DL) con esporas del hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*. Este hongo patógeno pertenece al grupo de los ascomicetos, produce esporas sexuales como también conidios (fase asexual) alojados en conidióforos, ocasionan enfermedades en las plantas que aparecen como canchros, tizones, antracnosis, marchitamientos vasculares, manchas foliares y del fruto, pudriciones del fruto, tallo y raíz, así como pudriciones blandas (Agrios, 2007). *Botrytis* es utilizado como modelo de hongo patógeno para infectar plantas en bioensayos que integran la

señalización de JA y la luz y evaluar la susceptibilidad de las plantas. Cerrudo *et al.* 2012 vieron que bajas relaciones rojo / rojo lejano (R/RL) reduce la resistencia de las plantas al ataque de *Botrytis* debido a su efecto sobre los genes de señalización del JA.

En la Figura 4.4-a se muestran los resultados del daño causado por el hongo (área infectada) para los diferentes tratamientos. Apoyando nuestra hipótesis de una mayor resistencia promovida por DL, observamos que las plantas WT (Col0) tuvieron una menor ocurrencia de lesiones ante el ataque de *Botrytis cinerea* al pasar a DL en comparación con los DC. Esta mayor resistencia podría deberse a la prolongación de la actividad fotosintética o por la acción de la señal fotoperiódica percibida por los fotorreceptores. Evaluamos plantas triples mutantes de genes de fotorreceptores (*phyA cry1 cry2*) que no perciben la señal fotoperiódica sin afectar la actividad fotosintética. Estas plantas no respondieron a los DL. En DC las plantas *phyA cry1 cry2* tuvieron la misma área infectada que en DL y el mismo nivel de infección que plantas WT en DC (Fig.4.4-a), indicando que la mayor resistencia es debida a la señal fotoperiódica de DL y no simplemente a la mayor disponibilidad de luz para fotosíntesis.

Para el caso de la floración, el fotoperíodo es percibido por los fotorreceptores *phyA*, *cry1* y *cry2* (Johnson *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1998). En el caso de la floración, estos fotorreceptores reducen la actividad de COP1, al menos en parte debido a la interferencia con la formación de un complejo entre COP1 y proteínas SPA1 (Saijo *et al.*, 2003). En plántulas etioladas, la exposición a la luz causa la relocalización de COP1 desde el núcleo (donde están sus blancos) hacia el citosol incrementando de este modo la abundancia de los factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis en el núcleo (Osterlund y Deng, 1998), pero cambios en la ubicación sub-celular no han sido descritos para COP1 en respuesta al fotoperíodo. Evaluamos la susceptibilidad de dos alelos de *cop1* (*cop1-4* y *cop1-6*), los resultados se presentan en la Figura 4.4-b y nos

muestra que los mutantes pierden la respuesta al fotoperíodo con una alta resistencia al ataque de patógenos tanto en DC como en DL. El área infectada de *cop1-4* y *cop1-6* fue similar al área infectada del WT en DL, sugiriendo que la señal fotoperiódica de DL percibida por *phyA*, *cry1* y *cry2* aumentaría las respuestas a JA a través de COP1 ya que los mutantes *cop1* se comportan en DC como si estuvieran en DL.

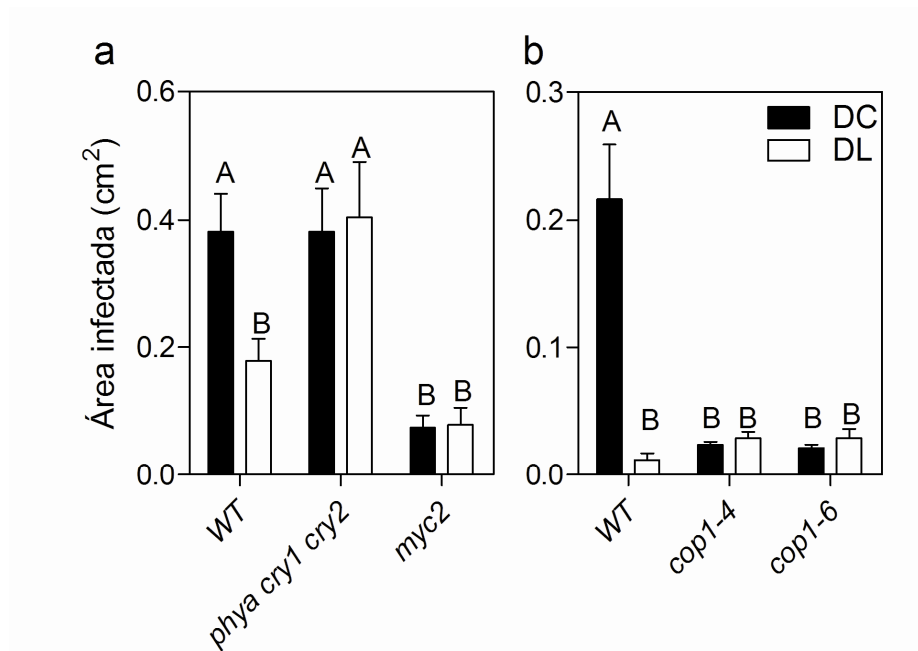


Figura 4.4: Daño ocasionado en las hojas por *Botrytis cinerea* (Área infectada) para plantas creciendo en DC y después de la inoculación siguieron en DC (barras negras) o pasaron a DL (barras blancas) para diferentes genotipos: **a-** WT (control), *phyA-cry1-cry2* y *myc2*; **b-** WT (control), *cop1.4* y *cop1.6*. El área infectada se midió transcurridas 48h desde la inoculación. Distintas letras indican diferencias significativas (LSD de Fisher, nivel de significancia=0,05).

Por otro lado, plantas mutantes *myc2* tienen una alta resistencia al ataque de hongos patógenos debido a un aumento de las defensas señalizadas por JA (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). Estos mutantes mantuvieron una alta resistencia en

ambos fotoperíodos (Fig.4.4-a) indicando que el aumento constitutivo de la señal de JA en plantas *myc2* diluye el efecto de los DL.

Todos estos resultados permiten aseverar que los DL otorgan una mayor resistencia al ataque de *Botrytis cinerea* a través de un aumento en la señalización mediada por JA. Varios componentes de la señalización de la luz (fotorreceptores) afectan la expresión de genes de respuesta al JA (Kazan y Manners, 2011). La exposición de plantas a luz UV-B promueve la expresión de genes de biosíntesis de JA y una rápida producción de la hormona (Izaguirre *et al.*, 2003). UV-B regula la expresión de genes de estrés que aparecen atenuados en plantas mutantes del gen *jar1* con reducida sensibilidad al JA. El exceso de luz, sentido por criptocromos y fototropinas (Li *et al.*, 2009), causa estrés en las plantas e induce la expresión de genes para ayudar a la planta a aclimatarse, la expresión de genes de biosíntesis y señalización de JA también inducidos por JA (Rossel *et al.*, 2007). La calidad de luz dentro de un cultivo es un regulador crítico de la señalización de JA (Moreno *et al.*, 2009; Demkura *et al.*, 2010). Plantas creciendo en canopeos densos con bajas relaciones R/RL o expuestas a luces RL presentan una menor resistencia a los insectos herbívoros (Izaguirre *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2009). Tallos de tomate expuestos a RL reducen los niveles de JA (Cagnola *et al.*, 2012). Bajas relaciones R/RL, percibidas por el fitocromo B (PhyB), regulan negativamente las respuestas al JA (Moreno *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011). También se ha observado que plantas de arroz (Xie *et al.*, 2011) y *Arabidopsis* (Kazan y Manners 2011) mutantes nulas de fotorreceptores mostraron mayor susceptibilidad a hongos patógenos, entre ellos *Botrytis cinerea* (Cerrudo *et al.*, 2012). La señalización del JA es controlada por señales internas y externas que proveen a la planta información acerca del estado fisiológico y el contexto ecológico que la rodea (Ballaré, 2011). La señal fotoperiódica ayuda a las plantas a ubicarse en las

estaciones del año y ajustarse a su entorno, nuestros hallazgos nos permiten inferir que esa información también le sirve a las plantas para regular la resistencia a los ataques estacionales de patógenos.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PARTE III)

EL FOTOPERÍODO COMO REGULADOR DEL PROCESO DE ABORTO

A. Regulación de la expresión génica de las proteínas con Arabinogalactanos (AGPs)

Del análisis estadístico de la expresión global de genes en respuesta al fotoperíodo aflora un comportamiento llamativo de los genes que codifican para las proteínas con Arabinogalactanos (AGPs). Los AGPs son glicoproteínas vegetales conformada por una proteína central glicosilada por uno o mas complejos de carbohidratos que tienen como principal componente los azúcares galactosa y arabinosa (Acosta-Garcia y Vielle-Calzada, 2004). Las plantas de *Arabidopsis* contienen aproximadamente 47 genes que codifican para esta familia (Schultz *et al.*, 2002), muchos AGPs presentan en su estructura dominios “*fasciclin-like*”, esta subfamilia de proteínas se denominan “*Fasciclin-Like Arabinogalactan-protein (FLAs)*” y en *Arabidopsis* son cerca de 21 genes los que codifican para este tipo de proteínas (Johnson *et al.*, 2003). En nuestros experimentos, 18 genes que codifican para AGPs mostraron una respuesta significativa al fotoperíodo y 14 de ellos lo hacen con el mismo patrón (Fig.5.1). Se observa que los niveles de expresión se mantienen bajos al final del día y cuando termina la luz los niveles ascienden. En DC lo niveles están bajos a las 8 h de comenzado el día pero cuando las plantas pasan a DL los niveles mínimos se prolongan por más tiempo. Por lo tanto, en DL la expresión de una gran parte de los AGPs es reducida.

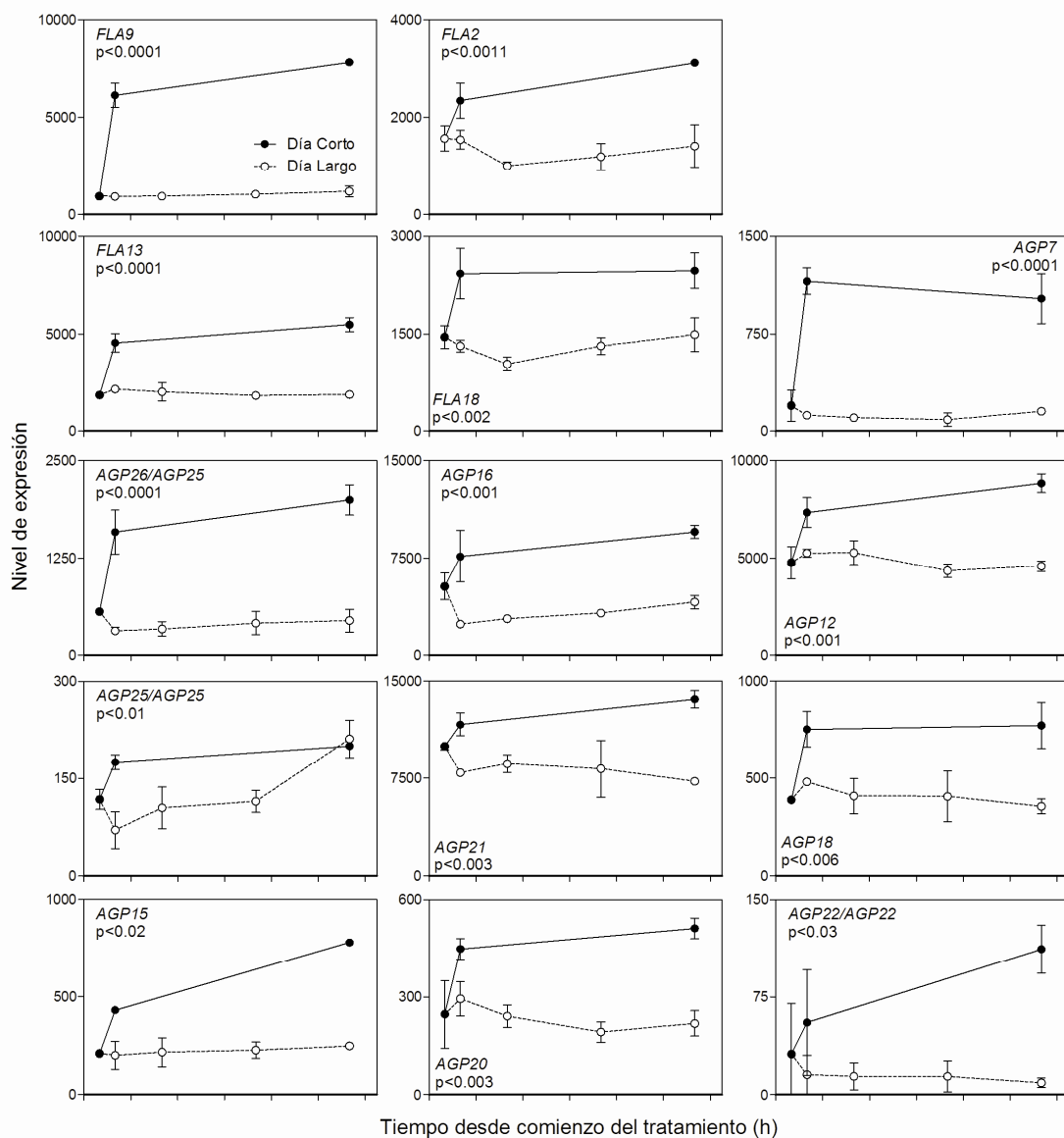


Figura 5.1: Expresión de los genes AGP y subfamilia FLA en función del tiempo desde el comienzo de los tratamientos de días largos (símbolos blancos) y días cortos (símbolos negros).

El AGP con efecto más significativo ($p=0.00000012$) es el gen que codifica para FLA9. Dada la marcada respuesta a fotoperíodos inductores de la floración, evaluamos el efecto de *FLA9* sobre la floración inducida por DL en dos alelos mutantes nulos de ese gen: *fla9-1* y *fla9-2*. En la Fig.5.2 observamos que, si bien hay un efecto

significativo del genotipo en ambos casos, los patrones son inconsistentes. El alelo *fla9-1* pareciera actuar como promotor de la floración mientras que el alelo *fla9-2* actuaría en el sentido contrario, inhibiendo a la floración. Estos resultados no demuestran la participación de *FLA9* en el proceso de floración.

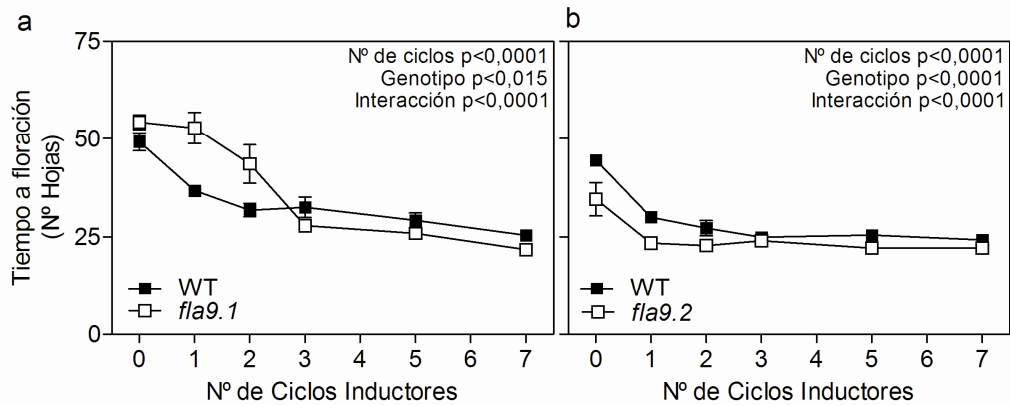


Figura 5.2: Tiempo a floración medido en número de hojas en función del número de ciclos inductores (días largos) para los mutantes **a**-*fla9.1*, **b**-*fla9.2*. Todos los mutantes son comparados al WT (genotipo salvaje). En cada gráfico se muestra los valores *p* obtenidos luego del análisis estadístico para el número de ciclos, el genotipo y la interacción del Nº de ciclos con el genotipo.

Es interesante notar que en experimentos paralelos a esta tesis doctoral, llevados a cabo durante el mismo período, encontramos cambios en la expresión de genes de AGPs que nos hicieron pensar en una función distinta a la del control de floración. En efecto, identificamos genes cuya expresión en la parte superior de la espiga de maíz entre 2 y 6 días después de la polinización (DDP) correlaciona positiva o negativamente con el aborto de granos en la misma porción de la espiga, en plantas de maíz de dos híbridos cultivados en distintas condiciones de estrés por sequía y densidad de siembra (Materiales y Métodos S.1 del APÉNDICE). Entre los genes correlacionados con el aborto encontramos genes vinculados a la constitución de la pared celular, al

metabolismo de carbohidratos, a la senescencia, a la muerte celular programada y a la embriogénesis; todos procesos que la literatura vincula de algún modo con el aborto de óvulos fecundados. Entre los genes identificados con mayor correlación se encuentra cuatro sondas que representan a 3 genes que codifican para AGPs: *Zm010066_x_at*, *Zm0100166_at*, *Zm013703_x_at* homólogo de *FLA1* de *Arabidopsis* y *Zm014734_x_at* que es homólogo de *FLA9* de *Arabidopsis* (Fig.5.3). Vemos que a los 4 DDP hay una correlación negativa entre la expresión genética y el número de granos abortados en la punta de la espiga, que es la zona crítica de ocurrencia de abortos en maíz.

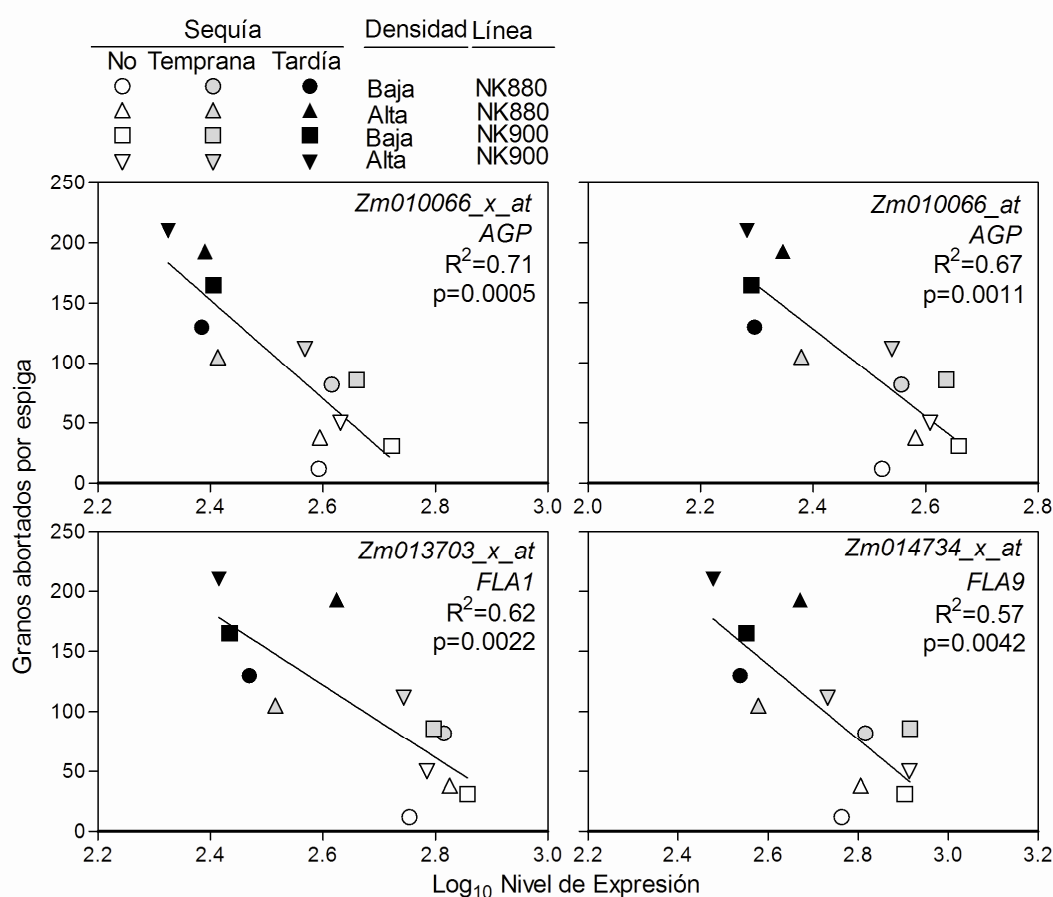


Figura 5.3: Correlación entre granos abortados y expresión genética de AGPs y subfamilia FLAs en espigas de maíz a 4 DDP. Las plantas corresponden a dos cultivares NK880 y NK900 pertenecientes a Syngenta, sembrados en densidades alta (10 pl m^{-2}) y baja (6 pl m^{-2}), sometidos a sequías tempranas o tardías. Se detalla el

nombre del gen en maíz, el nombre del gen homólogo en Arabidopsis, el coeficiente de regresión y su correspondiente valor p.

A mayor expresión de AGPs menor es la ocurrencia de abortos, sugiriendo que estas proteínas cumplen un rol en la viabilidad del embrión. Algunos autores ya han documentado que la inhibición de AGPs causa la inducción de la muerte celular programada (Gao y Showalter, 1999) y las respuestas a heridas (Guan y Nothnagel, 2004) en cultivos celulares de *Arabidopsis*. También en *Brassica napus* (Nabo) los AGP son importantes para la iniciación y mantenimiento de la embriogénesis (Tang *et al.*, 2006) que es el proceso mediante el cual se genera un embrión a partir de un óvulo fecundado (Taiz y Zeiger, 2010). En cereales los AGPs inducen la embriogénesis en embriones cultivados “*in vitro*” en trigo (Letarte *et al.* 2006), en cebada (Paire *et al.*, 2003) y en maíz (Borderies *et al.*, 2004). Todo los resultados publicados hasta el momento se refieren siempre a trabajos minuciosos y detallados en laboratorio, con cultivos celulares o cultivo de embriones “*in vitro*” bajo condiciones controladas.

B. Localización y función de los AGPs en óvulos de maíz

Sabíamos que los AGPs están distribuidos a lo largo de toda la planta, particularmente en la superficie celular cumpliendo importantes funciones en el crecimiento y desarrollos de las plantas, en la comunicación célula a célula, en la proliferación celular y el crecimiento embrionario (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000); y también contábamos con nuestros resultados de correlación negativa entre su expresión y el aborto. Conocimos la localización de los AGPs en óvulos fecundados de maíz a 4 DDP teñidos con colorantes (Materiales y métodos S.3, S.4 y S5 del APÉNDICE) que se adhieren a estas proteínas (Fig.5.4-a). Examinando el preparado

vemos que los AGPs aparecen en todas las células del óvulo pero principalmente en los haces vasculares, en la base del nucelo y en toda la periferia del pericarpio. Los AGPs ocupan lugares esenciales dentro del óvulo para la gestación del embrión como son los haces vasculares que es la vía de ingreso de los fotoasimilados y la base del nucelo que es la zona donde se diferenciará el embrión y el endosperma.

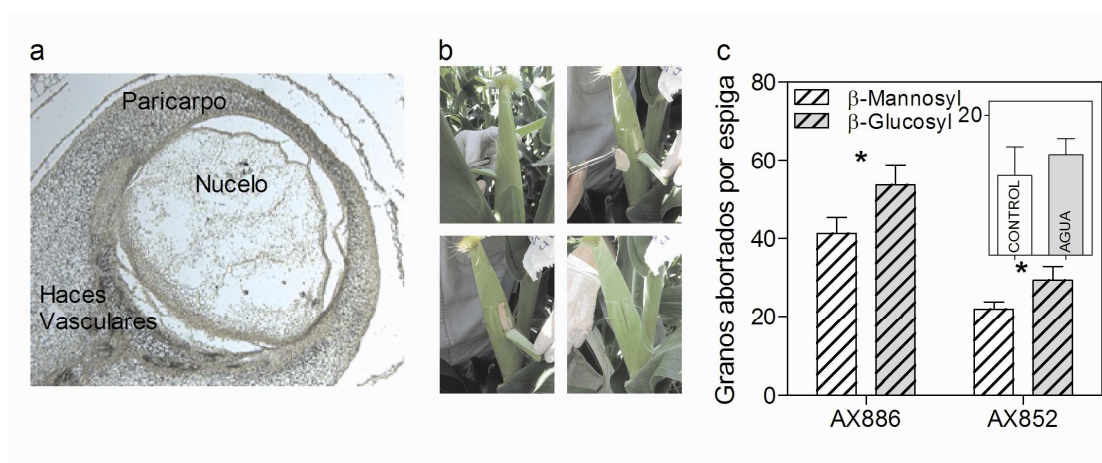


Figura 5.4: **a-** Óvulo fecundado de maíz a 4 DDP teñido con los reactivos de Yariv para visualizar la localización de AGPs en los tejidos. **b-** Metodología utilizada para la aplicación de los reactivos de Yariv sobre las flores femeninas de maíz a 4 DDP. **c-** Granos abortados en espigas tratadas con β -glucosyl y β -Mannosyl para dos cultivares AX886 y AX852. El cuadrante muestra el aborto natural de espigas no tratadas (Control) y el aborto en espigas manipuladas a las que se le agregó agua destilada (Agua). * significa $p > 0.05$.

Para evaluar si la correlación negativa entre la expresión de genes de AGPs y el aborto es parte de una relación causal, investigamos la función de los AGPs en el aborto de granos de maíz en plantas cultivadas a campo utilizando una herramienta experimental farmacológica. La misma está basada en dos colorantes sintéticos llamados “Reactivos de Yariv” (Seifert y Roberts, 2007). Uno de ellos es el β -glucosyl

que actúa precipitando a los AGPs impidiendo su funcionamiento, el otro es el β -Mannosyl con una estructura idéntica al anterior pero que no precipita a los AGPs y es usado como control negativo (Yariv *et al.*, 1962). Usando esta técnica se han estudiado los múltiples roles de los AGPs en las últimas décadas (Seifert y Roberts, 2007). Aplicamos los reactivos de Yariv sobre flores fecundadas (4 DDP) en espigas de maíz creciendo a baja densidad, libres de enfermedades y con una polinización sincronizada para minimizar inconvenientes con la fertilización (Fig.5.4-b). Se agregó una condición control con agua destilada para evaluar el grado de aborto causado por la manipulación de la espiga, que fue comparada con plantas que no recibieron ningún tratamiento. Contabilizamos los granos abortados 20 d después de la aplicación y los resultados se observan en la Figura 5.4-c. Vemos que la aplicación de β -glucosyl causa un mayor aborto que el control negativo β -Mannosyl para dos híbridos comerciales de maíz AX886 y AX852. La precipitación y posterior inhibición de los AGPs debida al β -glucosyl causó el aborto de los granos de maíz avalando el significado funcional de la correlación negativa existente entre la expresión genética y el aborto.

C. Regulación del aborto por el fotoperíodo, el rol de FLA9

Los resultados expuestos nos permiten hipotetizar que los AGPs participan en el mecanismo de control de abortos y que *en Arabidopsis* ese mecanismo posiblemente esté regulado por el fotoperíodo. Para probar nuestra hipótesis contabilizamos el aborto de plantas de *Arabidopsis* mutantes de *FLA9* (*fla9-1*) creciendo bajo fotoperíodo de DC o DL. Los resultados se pueden visualizar en la Figura 5.5. En primer lugar podemos destacar la mayor ocurrencia de abortos en DL en comparación con DC para ambos genotipos ($p > 0.0001$). En segundo lugar podemos observar que en DL el mutante *fla9-1* tuvo una mayor tasa de abortos en comparación con el WT. Esa diferencia no se observa

cuando las plantas son cultivadas en DC. Estos resultados indican que en DL aumenta la proporción de granos abortados en *Arabidopsis* por mecanismos no conocidos, pero la mayor expresión de *FLA9* en esas condiciones parcialmente compensa la vía negativa.

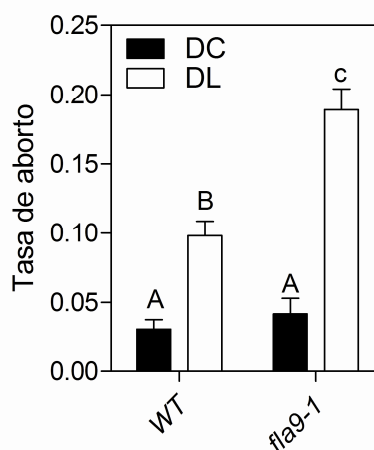


Figura 5.5: Tasa de aborto de plantas de genotipo WT y *fla9-1* creciendo en días cortos y días largos. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Podemos deducir que los AGPs forman parte de un mecanismo de control de aborto que está conservado en las plantas ya que se encuentra en *Arabidopsis* y maíz, que además está regulado por el fotoperíodo. En otras especies se ha documentado el rol que tienen el fotoperíodo en el establecimiento de las estructuras reproductivas y sus consecuencias sobre la descendencia. En trigo (PDL), distintas fechas de siembra exponen a las plantas a diferentes condiciones fotoperiódicas (DC o DL). Los DL aceleran la tasa de desarrollo de los flósculos, adelantando el tiempo en el que alcanzan la mayor tasa de crecimiento y reduciendo el número de flores fértiles por espiguilla al momento de la antesis (Gonzalez *et al.*, 2003; 2005; Miralles *et al.*, 2000). El número de flores fértiles es un componente clave en el rendimiento del trigo ya que define el número de granos (Fisher, 1984). Ghiglione *et al.* (2008) demostraron que los DL actúan de señal que promueve la expresión de genes regulando positivamente procesos

de autofagia en los flósculos que determina el número de flores fértiles previo a la antesis. Así como en otras especies, nuestros resultados nos permiten concluir que en *Arabidopsis* los DL disminuyen los niveles de AGPs causando una mayor tasa de abortos, mecanismo que le permitiría ajustar a las plantas el número de semillas de su descendencia en función de las condiciones ambientales imperantes.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES

A. Conclusión general

De todas las señales ambientales que llegan a la planta, la señal fotoperiódica es una de las más estables. Tiene una variación diaria paulatina y un ciclo anual que se repite año tras año, convirtiéndola en una fuente de información fiable con la que evolucionaron las plantas. Esta señal fotoperiódica le sirve a las plantas para ubicarse en las estaciones anuales, ajustarse a su entorno y definir el tiempo a floración. *Arabidopsis* (PDL) requiere de sucesivos DL para acelerar su floración, la integración de esta señal fotoperiódica es a través de la persistencia de niveles altos de expresión del gen *FT* con máximos relativamente estables en ciclos sucesivos. Los resultados de nuestros experimentos nos permiten asegurar que el fotoperiodo, además de controlar el tiempo a floración, sirve de señal para ajustar el nivel de las defensas de las plantas ante patógenos y regular la tasa de aborto de semillas.

B. Conclusiones parciales

B.1. El fotoperíodo como regulador del tiempo a floración

El fotoperíodo es una de las principales fuentes de información para las plantas y define uno de los eventos fisiológicos más trascendentes desde el punto de vista agronómico del ciclo de vida de los cultivos: la floración. Conocer los cambios causados por el fotoperíodo es de interés desde la escala ecofisiológica, evaluando el comportamiento a campo, hasta la escala molecular donde están las bases genéticas responsables en parte de esos comportamientos. Los transcriptomas de plantas creciendo siempre en DL son diferentes que en DC (Micheal *et al.*, 2008). En esta tesis demostramos que un sólo ciclo de DL en plantas de *Arabidopsis* creciendo en DC es suficiente para inducir cambios en la expresión de genes vinculados a la floración que

en buena medida reproducen aquellos causados por exposiciones prolongadas a DL, a pesar de que ese único DL no es suficiente para alcanzar el mínimo tiempo a floración. En nuestras condiciones fueron necesarios 3 DL para saturar la inducción fotoperiódica de la floración en *Arabidopsis*. La aceleración de la floración fue gradual al aumento de ciclos inductores hasta minimizar el tiempo a floración el tercer DL. El mecanismo que tienen estas plantas para distinguir entre el primer, segundo y tercer DL, integrando temporalmente la señal fotoperiódica, sería la persistencia en el tiempo de una señal que es la expresión alta de *FT* en DL. Con 1 DL *FT* aumenta su nivel de expresión, a los 3 DL la expresión diferencial de *FT* es similar al primer DL. Para saturar la inducción fotoperiódica sería necesario que la expresión diferencial de *FT* permanezca durante tres días. Probablemente, en el ápice la permanencia de *FT* por encima de ciertos valores mínimos mantendría los procesos de inducción floral hasta alcanzar el menor tiempo a floración al 3 DL.

Si bien *FT* es el principal gen de la floración, muchos otros genes menores colaboran en el evento. Los DL inhiben la expresión de genes que retrasan la floración y promueven la expresión de genes que aceleran la floración, potenciando así la respuesta a la floración. También los DL promueven la expresión de genes que retrasan la floración y reducen genes que aceleran la floración, contrarrestando la respuesta fotoperiódica. El momento preciso de la floración resultará entonces de un balance entre fuerzas positivas, que potencian la señal de DL, y fuerzas negativas, que contrarrestan la señal de DL. Además, cuando la señal fotoperiódica aparece de forma limitante la floración ocurrirá por medio de la vía fotoperiódica pero la respuesta es condicionada por la vía autónoma.

B.2. *El fotoperíodo como regulador de la defensa de las plantas*

Las defensas de las plantas mediadas por JA son reguladas por señales luminosas causadas por plantas vecinas (Ballaré, 2011). En esta tesis demostramos que además las señales fotoperiódicas son importantes, ya que los DL fortalecen la resistencia potenciando la señalización por JA. Los DL promueven la expresión de genes cuya expresión es promovida por JA y reprime la expresión de genes cuya expresión es también reprimida por JA. En nuestros experimentos con plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Botrytis cinerea*, la menor susceptibilidad de las plantas en DL no fue causada por la mayor actividad fotosintética debida a la prolongación de las horas de luz, ya que los triples mutantes *phyA cry1 cry2* (que no perciben la señal fotoperiódica) tuvieron la misma área infectada en DC y DL, con el mismo nivel de infección que plantas WT en DC. Indicando que el fotoperíodo es una señal que regula la señalización del JA y las defensas de las plantas.

B.3. *El fotoperíodo como regulador del proceso de aborto de semillas*

El éxito reproductivo de una planta también implica garantizar el establecimiento de la progenie. Para ello la planta madre, además de dotar a las semillas con las suficientes reservas y un adecuado control del proceso de la germinación, también debe ajustar el número de semillas que dispersa para regular la competencia de la progenie (Sadras, 2007). Nosotros demostramos que en los DL, cuando las condiciones son favorables porque se extiende la actividad fotosintética y producción de fotoasimilados, se dispara un mecanismo de aborto de granos en las silicuas de *Arabidopsis* que serviría para adecuar la fecundidad de la planta y garantizar el establecimiento de la progenie. Este mecanismo, en el que están involucradas las proteínas con AGP, está conservado en maíz accionado en situaciones de estrés hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. y Shinozaki, K.** 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9, 1859-1868.
2. **Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., y Araki, T.** 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052-1056.
3. **Acosta-García, G. y Vielle-Calzada, J.P.** 2004. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16, 2614-2628.
4. **Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J.J., Albani, M.C., Coupland, G. y Turck, F.** 2010. cis-regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22, 1425-1440.
5. **Agrios, G.N.** 2007. Fitopatología. Editorial Limusa, México.
6. **Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P. y Kay, S.A.** 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293, 880-883.
7. **An, H.L., Roussot, C., Suárez-Lopez, P., Corbesler, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., y Coupland, G.** 2004. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* 131, 3615-3626.

8. **Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. y Kazan, K.** 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 3460-3479.
9. **Andrés, F. y Coupland, G.** 2012. The genetic basis of flowering response to seasonal cues. *Nature* 13, 627-639.
10. **Araki, T. y Komeda, Y.** 1993. Analysis of the role of the late-flowering locus, GI, in the flowering of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 3, 231-239.
11. **Aukerman, M.J. y Sakai, H.** 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* 15, 2790-2741.
12. **Ballaré, C.L.** 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Plant Science* 16(5), 249-257.
13. **Berger, S., Bell, E. y Mullet, J.E.** 1996. Two methyl jasmonate insensitive mutants show altered expression of AtVSP in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* 111, 525-531.
14. **Boccalandro, H.E., Rossi, M.C., Saijo, Y., Deng, X.W. y Casal, J.J.** 2004. Promotion of photomorphogenesis by cop1. *Plant Molecular Biology* 56(6), 905-915.
15. **Borderies, G., le Béhec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deuniff, E., Beckert, M., Dumas, C. y Matthys-Rochon, E.** 2004. Characterization of protein secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* 83(5), 205-212.

16. **Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. y Dean, C.** 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* 16, S18-S31.
17. **Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H.B., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J. y Mundy, J.** 2006. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene- dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* 47, 532-546.
18. **Browse, J.** 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60, 183-205.
19. **Büning, E.** 1936. Die endogene tagesrhythmik als grundlage der photoperidischen reaction. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 54, 590-607.
20. **Cagnola, J.I., Ploschuk, E., Benech-Arnold, T., Finlayson, S. y Casal, J.J.** 2012. Stem transcriptome reveals mechanisms to reduce energetic cost of shade-avoidance response in tomato. *Plant Physiology* 160, 1110-1119.
21. **Calderini, D.F., Reynolds, M.P. y Slafer, G.A.** 1999. Genetic gains in wheat yield and main physiological changes associated with them during the 20th century. In: Satorre E.H. y Slafer G.A. (Eds.), *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. New York. Food Product Press. pp. 351-377.
22. **Campoli, C., Drosse, B., Searle, I., Coupland, G. y von Korff, M.** 2012. Functional characterization of HvCO1, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of CONSTANS. *The Plant Journal* 69(5), 868-880.
23. **Cao, S., Jiang, S. y Zhang, R.** 2006. The role of GIGANTEA gene in mediating the oxidative stress response and in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation* 48, 261-270.

24. **Cao, S., Ye, M. y Jiang, S.** 2005. Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24, 683-690.
25. **Casal, J.J., Frankhauser, C., Coupland, G. Blázquez, M.A.** 2004. Signaling developmental plasticity. *Trends in Plant Science* 9, 309-314.
26. **Castillejo, C. y Pelaz, S.** 2008. The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology* 18, 1338-1343.
27. **Cerrudo, I., Keller, M.M., Cargnel, M.D., Demkura, P.V., de Wit, M., Patitucci, M.S., Pierik, R., Pieterse, C.M.J. y Ballaré, C.L.** 2012. Low Red/Far-Red ratios reduce Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via COI1-JAZ10-dependent, Salicylic Acid-Independent mechanism. *Plant Physiology* 158, 2042-2052.
28. **Chung, H.S., Cooke, T.F., Depew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y. y Howe, G.A.** 2010. Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *The Plant Journal* 63, 613-622.
29. **Clarke, J.D. y Zhu, T.** 2006. Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *The Plant Journal* 45, 630-650.
30. **Coupland, G.** 1995. Genetic and environmental control of the flowering time in Arabidopsis. *Trends in Genetics* 11, 393-397.
31. **Curtis, I., Nam, H.G., Yun, J.Y. y Seo, K.H.** 2002. Expression of an antisense GIGANTEA (GI) gene fragment in transgenic radish causes delayed bolting and flowering. *Transgenic Research* 11, 249-256.

32. **Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, M., Udvardi, M.K. y Wolf-Ru.** 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 5-17.
33. **Dalchau, N., Baek, S.J., Briggs, H.M., Robertson, F., Dodd, A.N., Gardner, M.J., Stancombe, M.A., Haydon, M.J., Stan, G.B., Goncalvez, J.M. y Webb A.A.R.** 2011. The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to source. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 108, 5104-5109.
34. **David, K.M., Armbruster, U., Tama, N., Putterill, J.** 2006. *Arabidopsis GIGANTEA* protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Letters* 580, 1193-1197.
35. **De Pater, S., Pham, K., Memelink, J. y Kijne, J.** 1997. RAP-1 is an *Arabidopsis* MYC-like R protein homologue that binds to G-box sequence motifs. *Plant Molecular Biology* 34, 169-174.
36. **Demkura, P.V., Abdala, G., Baldwin, I.T. y Ballaré, C.L.** 2010. Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* 152, 1084-1095.
37. **Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., McWatters, H.G., Kozma-Bognár, L., Nagy, F., Millar, A.J. y Amasino R.M.** 2002. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 419, 74-77.
38. **Eimert, K., Wang, S.M., Lue, W.L. y Chen, J.** 1995. Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7, 1703-1712.

39. **Endo, M., Mochizuki, N., Suzuki, T., y Nagatani, A.** 2007. CRYPTOCHROME2 in vascular bundles regulates flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 84-93.
40. **Evans, L.T.** 1998. Feeding the ten billion: plants and population growth. Cambridge. Cambridge University Press.
41. **Fischer, R.A.** 1984. Wheat. In: Smith, W.H. y Banta, J.J. (Eds), Potential productivity of field crops under different environments. Los Baños. IRRI. pp. 129-154.
42. **Fonseca, S., Chico, J.M. y Solano, R.** 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 539-547.
43. **Fornara, F., de Montaigu, A. y Coupland, G.** 2010. SnapShot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell* 141(3), 550 e1-e2.
44. **Fowler, S., Lee, K., Onouchim, H., Smach, A., Richardson, K., Morris, B, Coupland, G. y Puterill, J.** 1999. GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO Journal* 18, 4679-4688.
45. **Gao, H., Sage, T.L. y Osteryoung, K.M.** 2006. FZL, an FZOlike protein in plants, is a determinat of thylakoid and chloroplast morphology. *Proceedings of the National Academy of Science* 103, 6759-6764.
46. **Gao, M. y Showalter, A.M.** 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal* 19(3), 321-331.

47. **Garner, W.W. y Allard, H.A.** 1920. Effect of the relative length of day and night and other factor of the environment of growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* 18, 553-603.
48. **Garner, W.W. y Allard, H.A.** 1923. Further studies on photoperiodism, the response of plants to relative length of day and night. *Journal of Agricultural Research* 23, 871-920.
49. **Gfeller, A., Baerenfaller, K., Loscos, J., Chételat, A., Baginsky, S. y Farmer, E.** 2011. Jasmonate controls polypeptide patterning in undamaged tissue in wounded *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 157, 1797-1807.
50. **Ghiglione, H.O., González, F.G., Serrago, R., Maldonado, S.B., Chilcott, C., Curá, J.A., Miralles, D.J., Zhu, T. y Casal, J.J.** 2008. Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. *The Plant Journal* 55, 1010-1024.
51. **Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakachita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takashashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S y Shimada, Y.** 2008. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data, analysis and data access. *The Plant Journal* 55, 526-542.
52. **González, F.G., Slafer, G.A. y Miralles, D.J.** 2003. Floret development and spike growth as affected by photoperiod during stem elongation in wheat. *Field Crops Research* 81, 29-38.

53. **González, F.G., Slafer, G.A. y Miralles, D.J.** 2005. Floret development and survival in wheat plants exposed to contrasting photoperiod and radiation environments during stem elongation. *Functional Plant Biology* 32, 189-197.
54. **Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby W.L., Yang, M., Ma, H. y Estelle, M.** 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 13, 1678-1691.
55. **Griffiths, S., Dunford RP., Coupland, G., Laurie DA.** 2003. The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131, 1855-1867.
56. **Guan, Y. y Nothnagel, E.A.** 2004. Binding of arabinogalctan protein by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* 135, 1346-1366.
57. **Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., y Lin, C.** 1998. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.
58. **Harmer, S.L.** 2009. The circadian system in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 60, 357-377.
59. **Hartmann, U., Höhmann, S., Nettekheim, K., Wisman, E., Saedler, H. y huijser, P.** 2000. Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 21(4), 351-360.
60. **Hayama, R., Izawa, T. y Simamoto, K.** 2002. Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering differential display method. *Plant Cell Physiology* 43(5), 494-504.

61. **Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., Shimamoto, K.** 2003. Adaptation of photoperiodic control pathway produces short-day flowering in rice. *Nature* 422, 719-722.
62. **Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., morin, J., Vardy, M.E., Ellis, N., Beltrán, J.P., Rameu, C., y Weller, J.** 2005. Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiology* 137, 1420-1434.
63. **Hollis, C.A.** 1999. Characterizing GIGANTEA; an Arabidopsis gene that regulates flowering-time. MSc thesis, University of Auckland.
64. **Howe, G.A.** 2010. Ubiquitin ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiology* 154, 471-474.
65. **Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H. y Deng, X.W.** 2000. FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes & Development* 14, 1958-1970.
66. **Huq, E., Tepperman, J.M. y Quail, P.H.** 2000. GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97, 9789-9794.
67. **Imaizumi, T. y Kay, S.A.** 2006. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *TRENDS in Plant Science* 11(11), 550-558.
68. **Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., y Kay, S.A.** 2005. FKF1 F-BOX protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science* 309, 293-297.

69. **Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., y Kay S.A.** 2003. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in Arabidopsis. *Nature* 426, 302-306.
70. **Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. y Ballaré, C.L.** 2006. Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 103, 7170-7174.
71. **Izaguirre, M.M., Scopel, A.L., Baldwin, I.T. y Ballaré, C.L.** 2003. Convergent responses to stress: solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* 132, 1755-1767.
72. **Jackson, S.D.** 2009. Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* 181, 517-531.
73. **James, A.B., Monreal, J.A., Nimmo, G.A., Kelly, C.L., Herzyk, P., Jenkins, G.I. y Nimmo, H.G.** 2008. The circadian clock in Arabidopsis roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science* 322, 1832-1835.
74. **Jang, S., Torti, S. y Coupland, G.** 2009. Genetic and spatial interaction between *FT*, *TSF* and *SVP* during the early stages of floral induction in Arabidopsis. *The Plant Journal* 60, 614-625.
75. **Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N.P., y Whitelam, G.C.** 1994. Photoresponses of light-grown phyA mutants of Arabidopsis. Phytochrome A is required for the perception of daylength extension. *Plant Physiology* 105, 141-149.
76. **Johnson, K.J., Jones, B.J., Bacic, A. y Schultz, C.J.** 2003. The fasciclin-like arabinogalactan protein of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology* 133, 1911-1925.

77. **Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H. y Park, C.M.** 2007. The GIGANTEA-regulated microRNA283 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 2736-2748.
78. **Kantolic, A.G. y Slafer, G.A.** 2001. Photoperiod sensitivity after flowering and seed number determination in indeterminate soybean cultivars. *Field Crops Research* 72, 109-118.
79. **Kantolic, A.G. y Slafer, G.A.** 2005. Reproductive development and yield components in indeterminate soybean affected by post-flowering photoperiod. *Field Crops Research* 93, 212-222.
80. **Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., y Weigel, D.** 2008. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286, 1962-1965.
81. **Kazan, K. y Manners, J.M.** 2011. The interplay between light and jasmonate signalling during defense and development. *Journal of Experimental Botany* 62, 4087-4100.
82. **Kim, B.H. y Von Armin, A.G.** 2009. FIERY1 regulates light-mediated repression of cell elongation and flowering time via its 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase activity. *The Plant Journal* 58, 208-219.
83. **Kim, W. C., Ko, J. H., Kim, J. Y., Kim, J. M., Bae, H. J., Han, K. H.** 2012. MYB46 directly regulates the gene expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis. *The Plant Journal* (artículo aceptado, inédito publicado online).
84. **Klebs, G.** 1913. Über das verhältnis der aussenwelt zur entwicklung der pflanze. *Heidelberg Akademie der Wissenschaften* 5, 1-47.

85. **Knott, J.E.** 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 31, 152-154.
86. **Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwuabuchi, M., y Araki, T.** 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960-1962.
87. **Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T. y Yano, M.** 2012. Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short day condition. *Plant Cell Physiology* 43, 1096-1105.
88. **Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., Soppe, W.** 1998. Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* 49, 345-370.
89. **Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M. y Goto, K.** 2003. Arabidopsis Terminal Flower 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and repress both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *The Plant Cell* 44, 555-564.
90. **Kurepa, J., Smalle, J., Van Montagu, M. y Inez, D.** 1998. Oxidative stress tolerance and longevity in Arabidopsis: the late-flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat. *The Plant Journal* 14, 759-764.
91. **Lagercrantz, U.** 2009. At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *Journal of Experimental Botany* 60(9), 2501-2515.
92. **Langdon, T., Thomas, A., Huang, L., Farrar, K., King, J. y Armstead, I.** 2009. Fragments of the key flowering gene GIGANTEA are

associated with helitron-type sequences in the Pooideae grass *Lolium perenne*. BMC Plant Biology 9, 70.

93. **Letarte, J., Simion, E., miner, M. y Kasha, K.J.** 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embriogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. Plant Cell Reports 24, 691-698.
94. **Levy, Y.Y. y Dean, C.** 1998. Control of flowering time. Current Opinion in Plant Biology 1, 49-54.
95. **Li, C., Dubcovsky, J.** 2008. Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interaction with FDL2. The Plant Journal 55, 543-554.
96. **Li, J., Bradner, G. y Tapio Palva, E.** 2004. The WRKY70 Transcription Factor: A node of convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in plant defense. The Plant Cell 16(2), 319-331.
97. **Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. y Niyogi, K.K.** 2009. Sensing and responding to excess light. Annual Review of Plant Biology 60, 239-260.
98. **Locke, J.C.W., Kozma-Bognár, L., Gould, P.D., Fehér, B., Kevei, E., Nagy, F., Turner, M.S., Hall, A. y Millar, A.J.** 2006. Experimental validation of a predicted feedback loop in multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. Molecular System Biology 2:59.
99. **Locke, J.C.W., Millar, A.J. y Turner, M.S.** 2005a. Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Theoretical Biology 234, 383-393.
100. **Locke, J.C.W., Southern, M.M., Kozma-Bognár, L., Hibberd, V., Brown, P.E., Turner, M.S. y Millar, A.J.** 2005b. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. Molecular System Biology 1:2005.0013.

101. **Lorenzo, O., y Solano, R.** 2005. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 532-540.
102. **Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R.** 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 1938-1950.
103. **Majewska-Sawka, A. y Nothnagel, E.A.** 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology* 122, 3-10.
104. **Marquardt, S., Boss, P.K., Hadfield, J. y Dean, C.** 2006. Additional targets of the *Arabidopsis* autonomous pathway members, FCA and FY. *Journal of Experimental Botany* 57(13), 3379-3386.
105. **Mazzella, M.A., Cerdán, P.D., Staneloni, R.J., Casal, J.J.** 2001. Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of *Arabidopsis* development. *Development* 128, 2291-2299.
106. **McClung, C.R.** 2006. Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell* 18, 792-803.
107. **McClung, C.R.** 2008. Comes a time. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 514-520.
108. **McClung, C.R. y Gutiérrez, R.A.** 2010. Network news: prime time for systems biology of the plant circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development* 20, 588-598.
109. **McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K. y Kazan, K.** 2005. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate

signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology* 139, 949-959.

110. **McNellis, T.W., von Armin, A.G., Araki, T., Komeda, Y., Moséra, S. y Deng, W.W.** 1994. Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *The Plant Cell* 6, 487-500.

111. **McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A. y Millar, A.J.** 2000. The *ELF3* zeitnehmer regulates light signaling to the circadian clock. *Nature* 408, 716-720.

112. **McWatters, H.G., kolmos, E., Hall, A., Doyle, M.R., Amasino, R.M., Gyula, P., Nagy, F., Millar, A.J. y Davis, S.J.** 2007. *ELF4* is required for oscillator properties of the circadian clock. *Plant Physiology* 144, 391-401.

113. **Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., priest, H.D., Sullivans, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M.J., Hong, F., Kay, S.A., Chory, J.** 2008. Network discovery pipeline elucidates conserved time of day specific cis regulatory modules. *PLoS Genetics* 4, e14.

114. **Michaels, S. y Amasino, R.** 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11, 949-956.

115. **Michaels, S.D. y Amasino, R.M.** 2001. Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant Cell* 13, 935-941.

116. **Millar, A.J. y Kay, S.A.** 1996. Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 93, 15491-15496.
117. **Miralles, D.J. y Richards, R.A.** 2000. Responses of leaf and tiller emergence and primordium initiation in wheat and barley to interchanged photoperiod. *Annals of Botany* 85, 655-663.
118. **Miralles, D.J., Richards, R.A. y Slafer, G.A.** 2000. Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 931-940.
119. **Mittag, M., Kiaulehn, S. y Johnson, C.H.** 2005. The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant Physiology* 137, 399-409.
120. **Mizoguchi, T., Wright, L., Fujiwara, S., Cremer, F., Lee, K., Onouchi, H., Mouradov, A., Fowler, S., Kamada, H., Putterill, J. y Coupland, G.** 2005. Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17(8), 2255-2270.
121. **Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.C., Dolan, S. y Lin, C.** 2003. Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 100, 2140-2145.
122. **Moreno, J.E., Tao, Y., Chory, J. y Ballaré, C.L.** 2009. Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 106, 4935-4940.

123. **Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G.** 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* 14, S111-S130.
124. **Mozley, D., Thomas, B.** 1995. Developmental and photobiological factor affecting photoperiodic induction in *Arabidopsis thaliana* Heynh. *Landsberg erecta*. *Journal of Experimental Botany* 46, 173-179.
125. **Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Williamson, B, Lyon, G.D. y Deighton, N.** 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: change in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of Experimental Botany* 53, 207-214.
126. **Oliverio, K.A., Crepy, M., Martin-Tryon, E., Mulich, E., Harmer, S.L., Putterill, J., Yanovsky, M.J. y Casal, J.J.** 2007. GIGANTEA regulates Phytochrome A-mediated photomorphogenesis independently of its role in the circadian clock. *Plant Physiology* 144(1), 495-502.
127. **Olszewski, N., Sun, T.P. y Gubler, F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell* 14, S61-S80.
128. **Osterlund, M.K. y Deng, X-W.** 1998. Multiple photoreceptors mediate the light induced reduction of GUS-COP1 from *Arabidopsis* hypocotyl nuclei. *The Plant Journal* 16, 201-208.
129. **Paire, A., Devauz, P., Lafitte, C., Dumas, C. y Matthys-Rochon, E.** 2003. Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promotes *in vitro* zygotic maize embryo formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73(2), 167-176.
130. **Park, D.H., Somer, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A. y Nam, H.G.** 1999. Control of circadian rhythms and

photoperiodic flowering by Arabidopsis GIGANTEA gene. Science 285, 1579-1581.

131. **Petersen, M., Broadersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., klessing, D.F., Martienssen, R., Mattsson, o., Jensen, A.B. y Mundy, J.** 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell 103, 1111-1120.

132. **Pokhilko, A., Hodge, S.K., Stratford, K., Knox, K., Edwards, K.D., Thomson, A.W., Mizuno, T. y Millar, A.J.** 2010. Data assimilation constrains new connection and components in a complex, eukaryotic circadian clock model. Molecular System Biology 6:416.

133. **Proveniers, M, Rutjens, B., Brand, M. y Smeekens, S.** 2007. The Arabidopsis TALE homebox gene ATH1 controls floral competency through positive regulation of FLC. The Plant Journal 52, 899-913.

134. **Quinteros, F.J., Garciadeblas, B. y Rodriguez-Navarro, A.** 1996. The SAL1 gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. The Plant Cell 8, 529-537.

135. **Riddell, J.A., Gries, G.A., Stearms, F.W.** 1958. Development of spring wheat. I. The effect of photoperiod. Agronomy Journal 50, 735-739.

136. **Rodriguez-Falcón, M., Bou, J., Prat, S.** 2006. Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with flowering response. Annual Review of Plant Biology 57, 151-180.

137. **Rosse, J.B., Wilson, P.B., Hussain, D., Woo, N.S., Gordon, M.J., Mewett, O.P., Howell, K.A., Whelan, J., Kazan, K. y Pogson, B.J.** 2007.

Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*.
American Society of Plant Biologist 19 (12) 4091-4110.

138. **Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. y Weisshaar, B.** 2003. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* 53, 247-259.

139. **Sadras, V.O.** 2007. Evolutionary aspects of the trade-off between seed size and number in crops. *Field Crops Research* 100, 125-138.

140. **Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., y Deng, X.W.** 2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Development* 17, 2642-2647.

141. **Salathia, N., Davis, S.J., Lynn, J.R., Michaels, S.D., Amasino, R.M. y Millar, A.J.** 2006. FLOWERING LOCUS C -dependent and -independent regulation of the circadian clock by the autonomous and vernalization pathways. *BMC Plant Biology*, 6:10.

142. **Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., y Coupland, G.** 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616.

143. **Sánchez, S., Cagnola, J.I., Crepy, M, Yanovsky, M.J. y Casal, J.J.** 2010. Balancing forces in the photoperiodic control of flowering. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 451-460.

144. **Sawa, M. y Kay, S.A.** 2011. GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 108, 11698-11703.

145. **Sawa, M., Kay, S.A. y Imaizumi, T.** 2008. Photoperiodic flowering occurs under internal and external coincidence. *Plant Signaling & Behavior* 3, 269-271.
146. **Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A. y Imaizumi, T.** 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318, 261-265.
147. **Schultz, C.J., Rumsewicz, M.P., Johnson, K.L., Jones, B.J., Gaspar, Y.M. y Bacic, A.** 2002. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology* 129(4), 1448-1463.
148. **Scortecci, K., Michaels, S.D. y Amasino, R.M.** 2003. Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 52, 915-922.
149. **Seifert, G.J. y Roberts, K.** 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58, 137-161.
150. **Shannon, S. y Meeks-Wagner, D.R.** 1991. A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *The Plant Cell* 3, 877-892.
151. **Sheldon, C.C., Burn, J.E., Perez PP, et al.** 1999. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell* 11, 445-58.
152. **Sheldon, C.C., Finnegan, E.J., Rouse, D.T., et al.** 2000. The control of flowering by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 418-422.

153. **Siddique, K.H.M., Kirby E.J.M. y Perry, M.W.** 1989. Ear-to-stem ratio in old and modern wheats; relationship with improvement in number of grains per ear and yield. *Field Crops Research* 21, 59-78.
154. **Slafer, G.A. y Rawson, H.M.** 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 393-426.
155. **Slafer, G.A., Araus J.L. y Richards, R.A.** 1999. Physiological traits to increase the yield potential of wheat. In: Satorre E.H. y Slafer G.A. (Eds.), *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. New York. Food Product Press. pp. 379-415.
156. **Somers, D.E., Kim, W.Y. y Geng, R.** 2004. The F-Box Protein ZEITLUPE Confers Dosage-Dependent Control on the Circadian Clock, Photomorphogenesis and Flowering Time. *The Plant Cell* 16, 769-782.
157. **Storey, J.D. y Tibshirani, R.** 2003. Statistical significance of genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 9440-9445.
158. **Suárez-López, P., Wheatley, K. Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., y Coupland, G.** 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410, 1116-1120.
159. **Summerfield, R.J., Asumadu, H., Ellis, R.H. y Qi, A.** 1998. Characterization of the photoperiodic response of post-flowering development in maturity isolines of soyabean (*Glicine max* (L.) Merrill) "Clark". *Annals of Botany* 82, 765-771.

160. **Sung, S. y Amasino, R.M.** 2004. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427, 159-164.
161. **Suza, W.P. y Staswick, P.E.** 2008. The role of JAR1 in jasmonyl-L-isoleucine production Turing *Arabidopsis* wound response. *Planta* 227, 1221-1232.
162. **Suzuki, A., Suriyagoda, L., Shigeyama, T., Tominaga, A., Sasaki, M., Hiratsuka, Y., Yoshinaga, A., Arima, S., Agarie, S., Sakai, T., Inada, S., Jikumaru Y., Kamiyac, Y., Uchiumie, T., Abee, M., Hashiguchif, M., Akashif, R., Satog, S., Kanekog, T., Tabatag, S. y Hirschh, A.M.** 2011. *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/ far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 108, 16837-16842.
163. **Taiz, L y Zeiger, E.** 2010. *Plant Physiology* 5ta Edición. Editorial Sinauer Associates. USA.
164. **Takada, S. y Goto, K.** 2006. TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *The Plant Cell* 15, 2856-2865.
165. **Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Sep, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K.** 2007. The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 805-818.
166. **Tang, X.C., He, Y.Q., Wang, Y. y Sun, M.X.** 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell

developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* 57(11), 2639-2650.

167. **Teotia, S. y Lamb, R. S.** 2011. RCD1 and SRO1 are necessary to maintain meristematic fate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62(3), 1271-1284.

168. **Thakare, D., Kumudini, S. y Dinkins, R.** 2010. Expression of flowering-time genes in soybean E1 near-isogenic lines under short and long day conditions. *Planta* 231, 951-963.

169. **Thomas, B., y Vince-Prue, D.** 1997. *Photoperiodism in Plants* (Segunda edición). San Diego, California. Academic Press.

170. **Torti, S., Fornara, F., Vincent, C., Andrés, F., Nordström, K., Góbel, U., Knoll, D., Schoof, H. y Coupland, G.** 2012. Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *The Plant Cell* 24(2), 444-462.

171. **Tournois, J.** 1912. Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis hâtifs. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 155, 297-300.

172. **Turck, F., Fornara, F. y Coupland, G.** 2008. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology* 59, 573-594.

173. **Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G., y Colot, V.** 2007. *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics* 3, e86.

174. **Turner, J.G., Ellis, C. y Devoto, A.** 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* 14, (1) 5153-5164.
175. **Upadhyay, A.P. Summerfield, R.J., Ellis, R.H., Roberts, E.H. y Qi, A.** 1994. Variation in the duration of the photoperiodic-sensitive and photoperiod insensitive phases of development to flowering among eight maturity isolines of soyabean (*Glicine max* (L.) Merrill) "Clark". *Annals of Botany* 74, 97-101.
176. **Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D. Samach, A. y Coupland, G.** 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303, 1003-1006.
177. **Vandepoele, K., Quimbaya, M., Caneuf, T., De Vayder, L. y Van de Peer, Y.** 2009. Unraveling transcriptional control in Arabidopsis using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiology* 150(2), 535-546.
178. **Vince-Prue, D.** 1994. The duration of light and photoperiodic responses. In: Kendrick R.E. y Kronenberg G.H.M. (Eds.), *Photomorphogenesis in plants* (Segunda Edición). Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 447-490.
179. **Watanabe, S., Xia, Z., Hideshima, R., Tsubokura, Y., Sato, S., Yamanaka, N., Takashashi, R., Anai, T., Tabata, S., Kitamura, K. y Harada, K.** 2011. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in Soybean maturity and flowering. *Genetics* 188, 395-407.
180. **Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Gourrierc, J.L., Samach, A., y Coupland, G.** 2006. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 2971-2984.

181. **Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., Wigdel, D.** 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309, 1056-1059.
182. **Xia, Z., Zhai, H., Liu, B., Kong, F., Yuan, X., Wu, H., Cober, E.R. y Hurada, K.** 2012. Molecular identification of genes controlling flowering time, maturity, and photoperiod response in soybean. *Plant Systematics and Evolution* 298, 1217-1227.
183. **Xie, X-Z., Xue, Y-J., Zhou, J-J., Zhang, B., Chang, H. y Takano, M.** 2011. Phytochromes regulate SA and JA signaling pathways in rice and are required for developmentally controlled resistance to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant* 4, 688-696.
184. **Xing, D., Zhao, H., Xu, R. y Quinn Li, Q.** 2008. *Arabidopsis* PCFS4, a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf11p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time. *The Plant Journal* 54, 899-910.
185. **Xu, l., Zhao, Z., Dong, A., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.P., Steinmetz, A. y Shen, W.H.** 2008. Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cell Biology* 28, 1348-1360.
186. **Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S.N., Bhatia, S. y Chattopadhyay, S.** 2005. A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* 17, 1953-1966.
187. **Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J.** 2006. The wheat and

barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 103, 19581-19586.

188. **Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y. y Sasaki, T.** 2001. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. The Plant Cell 12, 2473-2484.

189. **Yanovsky, M.J. y Kay, S.A.** 2003. Living by the calendar: How plants know when to flower. Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 265-275.

190. **Yanovsky, M.J., Izaguirre, M., Wagmaister, J.A., Gatz, C., Jackson, S.D., Thomas, B. y Casal, J.J.** 2000a. Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. The Plant Journal 23, 223-232.

191. **Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A. y Casal, J.J.** 2000b. A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. Current Biology 10, 1013-1015.

192. **Yanovsky, M.J., Kay, S.A.** 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. Nature 419, 308-312.

193. **Yariv, J., Rapport, M.M. y Graf, L.** 1962. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. Biochemistry Journal 85, 383-388.

194. **Yoo, S.J., Chung, K.S., Jung, S.H., Yoo, S.Y., Lee, J.S. y Ahn, J.H.** 2010. Brother of FT and TFL1 (BFT) has TFL1-like activity and functions redundantly with TFL1 in inflorescence meristem development in Arabidopsis. The Plant Journal 63, 241-253.

195. **Yoshida, R., Fekih, R., Fujiwara, S., oda, Atsushi., Miyata, k., Tomozone, Y., Nakawa, M., Niinuma, K., Hayashi, k., Ezura, H., Coupland, G. y Mizoguchi, T.** 2009. Possible role of EARLY FLOWERING 3 (ELF3) in clock-dependent floral regulation by SHORT VEGETATIVE PHASE in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 182, 838-850.
196. **Zeevaart, A.J.D.** 2006. Florigen coming of age after 70 years. *The Plant Cell* 18, 1783-1789.
197. **Zeilinger, M.N., Farre, E.M., Taylor, S.R., Kay, S.A. y Doyle, F.J.** 2006. A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Molecular System Biology* 2:58.
198. **Zhang, Z., Lenk, A., Andersson, M. X., Gjetting, T., Pedersen, C., Nielsen, M. E., Newman, M. A., Hou, B. H., Somerville, S. C., Thordal-Christensen, H.** 2008. A lesion-mimic syntaxin double mutant in *Arabidopsis* reveals novel complexity of pathogen defense signaling. *Molecular Plant* 3, 510-527.

APÉNDICES

MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

S.1. *Genotipos, condiciones de cultivo y diseño experimental del experimento con sequías*⁽¹⁾

El objetivo del experimento con sequías fue caracterizar los niveles de transcritos en la porción apical de espigas de maíz 2, 4 y 6 días luego de la polinización, y contabilizar el aborto de granos en madurez fisiológica. Se sembraron los cultivares de maíz NK880 y NK900 de Syngenta (portadores del transgen Bt) a dos densidades (6 y 10 plantas m⁻²) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 25' S, 58° 25' O), Argentina, en diciembre de 2005. Las parcelas contenían una capa de 180 cm de suelo franco arcillo limoso (Argiudol aérico, según taxonomía USDA) sobre el loess nativo (C). Las parcelas se sembraron manualmente para garantizar la densidad deseada, en hileras distanciadas a 50 cm. Cada parcela, de aproximadamente 25 m², fue aislada mediante un film de polietileno de 500 mm de espesor 2 m de profundidad para impedir el flujo lateral de agua y se irrigó mediante un sistema de riego por goteo controlado e independiente. Las parcelas se protegieron de la lluvia mediante un refugio automático de lluvia. Un techo de policarbonato transparente se desplegaba sobre las parcelas en forma inmediata cuando se humedecía el sensor de lluvia y se retraía cuando éste se secaba. El cultivo se mantuvo libre de malezas, plagas y enfermedades, fue fertilizado con 10 g de N m⁻² a la siembra y en V6 y se irrigó cuando fue necesario.

El experimento tuvo un diseño en parcelas sub-sub divididas (*split-split-plot*), en el cual se asignó el tratamiento de sequía a la parcela principal (3 parcelas por tratamiento). Se incluyó una condición control bien irrigada, un tratamiento de sequía

⁽¹⁾ El experimento a campo fue realizado por el Ing. Agr. MSci. Claudio A. Chimenti

temprana (i.e., sequía durante etapas tempranas del desarrollo de la espiga) y un tratamiento de sequía tardía (i.e. sequía en floración). Cada parcela contenía 4 subparcelas resultantes de la combinación del genotipo y la densidad de siembra (NK880 a 6 plantas m^{-2} , NK900 a 6 plantas m^{-2} , NK880 a 10 plantas m^{-2} y NK900 a 10 plantas m^{-2}). Las sub-sub parcelas correspondieron a los distintos momentos de muestreo. La porción apical de las espigas fue cosechada 2, 4 y 6 días luego de la polinización. Estos momentos de muestreo se eligieron considerando que 8 días luego de la polinización, las señales de aborto ya son evidentes en términos de tamaño y morfología de los granos.

El experimento incluyó 3 condiciones de irrigación x 3 repeticiones x 2 densidades siembra x 2 cultivares x 3 momentos de muestreo: 108 muestras procesadas independientemente para cuantificar la variabilidad biológica. Para cada muestra, se agrupó la porción apical de al menos 3 espigas para obtener datos representativos. Todos los muestreos se hicieron al mediodía para evitar la interferencia con los patrones diarios de expresión génica. Para determinar el número de granos abortados en el tercio apical de la espiga, 6 plantas (cada una rodeada de plantas intactas y espaciadas a la densidad deseada) fueron cosechadas de las hileras centrales de cada sub-parcela (i.e., para cada una de las tres repeticiones de cada combinación de condición de irrigación x densidad de siembra x genotipo) en madurez fisiológica (capa negra visible).

En el tratamiento de sequía temprana el riego se interrumpió 26 días luego de la siembra y los primeros signos de marchitez se detectaron 18 días después, cuando las espiguillas apicales (40% superior) de las espigas representativas estaban en estados de desarrollo temprano. En este momento, los estigmas del tercio superior de las espigas de los controles irrigados ya habían emergido. La emergencia de los estigmas del tercio superior de los tratamientos de sequía temprana comenzó cuando el riego ya había sido

reestablecido y las plantas estaban bien irrigadas. Motiva este tratamiento, que eventos de sequía durante la formación de los óvulos pueden no dejar indicios morfológicos del estrés y sin embargo afectar el destino de los granos luego de la polinización. El tratamiento de sequía tardía comenzó 44 días luego de la siembra y los primeros signos de marchitez se detectaron 17 días después, antes de que los estigmas del tercio superior de la espiga fueran visibles y finalizó durante el llenado de granos. En ambos casos, el tratamiento de sequía duró 37 días. El potencial agua de las hojas al atardecer se registró en 6 plantas (3 plantas por maceta de dos macetas) utilizando una bomba de presión.

Para evitar la falta de polen debido al retraso en el desarrollo de las espigas en respuesta a la sequía, se incluyó una parcela bien irrigada sembrada 10 días más tarde que el resto del experimento. La polinización se hizo manualmente entre las 10:00 y las 12:00 con polen fresco recién recolectado de plantas vecinas. Antes de la emergencia de los estigmas, las espigas se cubrieron con bolsas de papel blanco. Todos los estigmas expuestos de estas espigas, fueron polinizados manualmente en forma simultánea, el quinto día luego del comienzo de la emergencia de los estigmas (i.e. los óvulos de la base y el ápice de la espiga recibieron el polen simultáneamente). Se utilizó esta metodología para minimizar el efecto inhibitorio de los ovarios de la base de la espiga fecundados tempranamente sobre el desarrollo de los ovarios del ápice fecundados tardíamente, y el concomitante aumento del aborto de los últimos. Los estigmas permanecen receptivos por 6-7 días luego de ser expuestos a través de las chalas.

S.2. Genotipos, condiciones de cultivo y diseño experimental del experimento con tratamientos con reactivos de Yariv.

El objetivo de este experimento fue localizar la presencia de proteínas arabinogalactanos (AGP) en granos de maíz y probar farmacológicamente la

participación de AGPs en el control del aborto de granos. Los híbridos AX852 y AX886 de Nidera se sembraron a 5 plantas m⁻² en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, en un suelo franco arcillo limoso (Argiudol vértico, según taxonomía USDA) en diciembre de 2008. El experimento se mantuvo libre de malezas, plagas y enfermedades y se irrigó mediante un sistema de riego por goteo. Para sincronizar la polinización, las espigas fueron cubiertas con bolsas de papel antes de la emergencia de los estigmas y descubiertas 4 días después de la emergencia de los estigmas para permitir la polinización natural.

S.3. *Tratamientos con reactivos de Yariv*

El reactivo de Yariv β -glucosyl [1,3,5-tris(4- β -D-glycopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene] es un colorante rojo que se liga específicamente a los AGPs, mientras que el reactivo de Yariv α -mannosyl [1,3,5-tris(4- α -D-mannopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene] no reconoce a los AGP's y puede ser utilizado como control negativo (Yariv *et al.*, 1962). Los reactivos α -mannosyl y β -glucosyl Yariv fueron sintetizados de acuerdo a (Yariv *et al.*, 1962). Se probó la ligadura de los reactivos α -D-Mannosyl y β -D-galactosyl Yariv con AGPs de goma arábica (Sigma) en un blot de puntos en membranas de nitrocelulosa. El límite de detección fue alrededor de 100 ng de AGPs incubados con 500 μ g/mL de reactivo de Yariv β -glucosyl en 1% NaCl.

Para poder acceder a los ovarios fertilizados para aplicar el tratamiento con reactivo de Yariv, 4 días después de la polinización se hicieron dos cortes a través de las chalas a ambos lados de las espigas. Se ubicó sobre los ovarios fecundados una gasa embebida en una solución 100 μ M de reactivo α -mannosyl y β -glucosyl. Los cortes se cerraron y se contabilizaron los granos abortados 20 d después. Para evaluar el impacto

de los cortes y disturbio, otras plantas fueron expuestas a un tratamiento con agua destilada en lugar de reactivo de Yariv y luego comparadas con las plantas control que no fueron disturbadas.

S.4. Localización de AGPs con Yariv

Se utilizó β -glucosyl Yariv phenyl-glycoside para localizar AGPs. Los cortes fueron incubados durante la noche a 4°C en soluciones 0.5% NaCl (p/v) 500 μ g/mL Yariv. Los cortes (5–7 μ m) se montaron en portaobjetos y se observaron mediante un microscopio óptico Carl Zeiss Axiolab (Carl Zeiss, Jena, Germany).

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S.1: Coeficiente de correlación (r), coeficiente de regresión (R^2) y valor- p asociado entre la expresión genética y el tiempo a floración para diferentes genes vinculados al proceso de floración según TAIR (diciembre 2009).

Gen	r	R^2	Valor- p del r	Descripción
AT2G40080	0.99	0.97	0.00026	ELF4 (EARLY FLOWERING 4)
AT4G38680	0.97	0.93	0.00090	CSDP2/GRP2 (COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2, GLYCINE RICH PROTEIN 2)
AT5G17690	0.95	0.90	0.00168	TFL2 (TERMINAL FLOWER 2)
AT2G46340	0.93	0.87	0.00257	SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA-105 1)
AT4G32980	0.92	0.84	0.00360	ATH1 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN GENE 1)
AT3G51780	0.90	0.81	0.00472	ATBAG4 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 4)
AT1G22770	0.89	0.78	0.00551	GI (GIGANTEA)
AT1G03160	0.87	0.76	0.00650	FZL (FZO-LIKE)
AT3G26640	0.87	0.75	0.00688	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
AT5G48300	0.86	0.74	0.00729	ADG1 (ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE SMALL SUBUNIT 1)
AT1G25560	0.84	0.70	0.00927	AP2 domain-containing transcription factor
AT1G27650	0.80	0.64	0.01198	ATU2AF35A
AT1G04870	0.80	0.64	0.01227	Protein arginine N-methyltransferase family protein
AT5G42820	0.78	0.61	0.01382	ATU2AF35B
AT1G18450	0.74	0.55	0.01722	ATARP4 (ACTIN-RELATED PROTEIN 4)
AT4G30200	0.72	0.51	0.01966	VIN3 (VERNALIZATION INSENSITIVE 3)
AT1G65480	0.66	0.43	0.02533	FT (FLOWERING LOCUS T)
AT2G02560	0.64	0.41	0.02652	CAND1 (CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDYLATION DISSOCIATED)
AT2G44950	0.60	0.36	0.03085	HUB1 (HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1)
AT1G60220	0.59	0.35	0.03131	cysteine-type peptidase
AT1G12910	0.59	0.35	0.03165	ATAN11 (ANTHOCYANIN11)
AT2G42200	0.59	0.35	0.03172	squamosa promoter-binding protein-like 9 (SPL9)

AT4G04920	-	0.56	0.35	0.03203	similar to hypothetical protein OsI_033047
AT1G64990	-	0.55	0.31	0.03533	
AT1G31814	-	0.53	0.30	0.03579	FRL2 (FRIGIDA LIKE 2)
AT4G40060	-	0.53	0.28	0.03788	ATHB-16/ATHB16 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 16)
AT3G07650	-	0.53	0.28	0.03788	COL9 (CONSTANS-LIKE 9)
AT4G02440	-	0.52	0.28	0.03803	EID1 (EMPFINDLICHER IM DUNKELROTEN LICHT 1)
AT5G63980	-	0.51	0.27	0.03851	SAL1 (FIERY1)
AT5G02030	-	0.50	0.26	0.03972	LSN (LARSON)
AT2G22360	-	0.49	0.25	0.04095	DNAJ heat shock family protein
AT2G32950	-	0.49	0.24	0.04164	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)
AT1G01040	-	0.45	0.24	0.04215	DCL1 (DICER-LIKE1)
AT2G25930	-	0.45	0.21	0.04573	ELF3 (EARLY FLOWERING 3)
AT5G64930	-	0.44	0.20	0.04653	CPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5)
AT5G37770	-	0.43	0.19	0.04739	TCH2 (TOUCH 2)
AT5G04240	-	0.42	0.18	0.04842	ELF6 (EARLY FLOWERING 6)
AT1G77080	-	0.41	0.18	0.04932	MAF1 (MADS AFFECTING FLOWERING 1)
AT2G28550	-	0.39	0.17	0.05049	RAP2.7/TOE1 (TARGET OF EAT1 1)
AT5G41990	-	0.31	0.15	0.05192	WNK8 (Arabidopsis WNK kinase 8)
AT3G04680	-	0.30	0.10	0.06062	pre-mRNA cleavage complex family protein
AT1G10570	-	0.29	0.09	0.06153	Ulp1 protease family protein
AT2G35510	-	0.27	0.09	0.06204	SRO1 (SIMILAR TO RCD ONE 1)
AT3G06930	-	0.26	0.07	0.06461	protein arginine N-methyltransferase family protein
AT3G51630	-	0.60	0.07	0.06513	WNK5 (Arabidopsis WNK kinase 59)
AT2G01290	-	0.22	0.05	0.07005	ribose-5-phosphate isomerase
AT4G00450	-	0.21	0.04	0.07068	CRP (CRYPTIC PRECOCIOUS)
AT1G14400	-	0.20	0.04	0.07110	UBC1 (UBIQUITIN CARRIER PROTEIN 1)
AT3G57920	-	0.19	0.04	0.07252	Squamosa promoter-binding protein
AT2G02760	-	0.18	0.03	0.07354	ATUBC2 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 2)
AT2G21660	-	0.17	0.03	0.07493	ATGRP7 (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2)
AT5G62640	-	0.14	0.02	0.07792	ELF5 (EARLY FLOWERING 5)
AT2G21070	-	0.11	0.01	0.08032	FIO1 (FIONA1)
AT5G42400	-	0.11	0.01	0.08039	SET domain-containing protein (TXR7)
AT1G55250	-	0.11	0.01	0.08057	HUB2 (HISTONE MONO-UBIQUITINATION 2)
AT1G01060	-	0.10	0.01	0.08101	LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)
AT1G76710	-	0.10	0.01	0.08117	ASHH1/SDG26 (ASH1-RELATED PROTEIN 1)
AT3G01460	-	0.10	0.01	0.08183	MBD9 (METHYL-CPG-BINDING DOMAIN 9)
AT2G46240	-	0.09	0.01	0.08221	BAG6 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6)
AT2G44680	-	0.09	0.01	0.08255	CKB4 (CASEIN KINASE II BETA SUBUNIT 4)
AT2G13540	-	0.04	0.00	0.08716	ABH1 (ABA HYPERSENSITIVE 1)
AT1G79000	-	0.02	0.00	0.08928	HAC1 (P300/CBP ACETYLTRANSFERASE-RELATED PROTEIN 2 GENE)
AT3G22420	-	0.01	0.00	0.09022	WNK2 (WITH NO K 2)

Tabla S.2: Funciones sobre-representadas por los genes que componen cada cluster, con su valor p correspondiente. El análisis se realizó con la plataforma ATCOECIS.

	Función o Proceso (GO terms)	valor-p
Cluster 1	P coenzyme biosynthesis	5.54E-04
	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions	1.55E-03
	P hydrogen transport	1.71E-03
	P proton transport	1.71E-03

	P regulation of biosynthesis	2.01E-03
	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	3.10E-03
	F cation:cation antiporter activity	7.20E-03
	P response to organic substance	8.27E-03
	P response to carbohydrate stimulus	8.27E-03
	P carbohydrate mediated signaling	1.14E-02
	P regulation of cellular biosynthesis	1.65E-02
	P stomatal movement	1.98E-02
	P transcription initiation	2.48E-02
	C proton-transporting two-sector ATPase complex	2.74E-02
	P inorganic anion transport	3.15E-02
	P ATP synthesis coupled proton transport	3.44E-02
	P energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	3.44E-02
	P ATP biosynthesis	3.59E-02
	P ATP metabolism	3.59E-02
	P nucleoside phosphate metabolism	3.59E-02
	P hormone biosynthesis	3.89E-02
Cluster 2	F coenzyme binding	1.43E-04
	F cofactor binding	1.70E-04
	C cytoplasm	4.24E-03
	C cytoplasmic part	5.52E-03
	C endoplasmic reticulum	1.08E-02
	P response to ethylene stimulus	1.74E-02
	P defense response to pathogen, incompatible interaction	4.69E-02
	P response to pathogen	4.69E-02
	P defense response to pathogen	4.69E-02
	P response to pest, pathogen or parasite	5.93E-02
	F peptidase activity	5.96E-02
	P proteolysis	9.11E-02
	F cation transporter activity	9.26E-02
	F transporter activity	1.14E-01
	C plasma membrane	1.15E-01
	F oxidoreductase activity	1.17E-01
	P nitrogen compound metabolism	1.25E-01
	P response to other organism	1.54E-01
	F ion transporter activity	1.62E-01
	P response to hormone stimulus	2.44E-01
	P defense response	2.61E-01
Cluster 3	P response to ethylene stimulus	5.81E-05
	P tropism	4.05E-04
	P ethylene mediated signaling pathway	1.97E-03
	P gravitropism	2.18E-03
	P response to gravity	3.00E-03
	F voltage-gated ion channel activity	3.31E-03
	F GTPase regulator activity	4.14E-03
	P potassium ion transport	1.10E-02
	P glucan biosynthesis	1.24E-02
	F potassium channel activity	2.39E-02
	F ligand-gated ion channel activity	2.39E-02
	P chromatin remodeling	2.58E-02
	P positive regulation of flower development	2.58E-02
	C membrane fraction	2.78E-02
	P jasmonic acid mediated signaling pathway	2.98E-02
	C spindle	3.62E-02
	F heme binding	3.62E-02
	C cell fraction	3.85E-02
	F cation channel activity	3.85E-02
	P stomatal movement	4.08E-02
	P positive regulation of development	4.08E-02
Cluster 4	F voltage-gated ion channel activity	3.13E-05
	F cation channel activity	3.58E-05
	P seed germination	6.55E-05
	P negative regulation of metabolism	1.73E-04

	F potassium channel activity	4.01E-04
	P stomatal movement	9.49E-04
	P lignin metabolism	1.45E-03
	P negative regulation of transcription	1.57E-03
	P negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	1.96E-03
	P negative regulation of development	2.10E-03
	P negative regulation of cellular metabolism	2.40E-03
	P potassium ion transport	2.73E-03
	P aging	6.34E-03
	C integral to plasma membrane	9.97E-03
	P protein processing	1.24E-02
	C intrinsic to plasma membrane	1.24E-02
	F chromatin binding	1.42E-02
	P trichome morphogenesis (sensu Magnoliophyta)	1.51E-02
	P cellular morphogenesis during differentiation	1.70E-02
	P hormone transport	2.33E-02
	P auxin polar transport	2.33E-02
Cluster 5	P tropism	8.81E-07
	P detection of stimulus	9.69E-06
	P gravitropism	1.92E-05
	P response to gravity	5.17E-05
	P response to cytokinin stimulus	1.64E-04
	C nuclear body	2.58E-04
	P ethylene mediated signaling pathway	4.22E-04
	P hormone transport	6.15E-04
	P auxin polar transport	6.15E-04
	P response to red light	8.67E-04
	P hypersensitive response	1.19E-03
	C endosome	1.30E-03
	P gibberellic acid mediated signaling	1.87E-03
	P nitrogen compound catabolism	4.87E-03
	P negative regulation of signal transduction	4.87E-03
	P cytokinin mediated signaling	5.76E-03
	F structural constituent of cytoskeleton	1.04E-02
	P response to brassinosteroid stimulus	1.09E-02
	C cullin-RING ubiquitin ligase complex	1.59E-02
	F polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase activity	1.88E-02
Cluster 6	P trichoblast differentiation	1.88E-02
	P cellular morphogenesis	9.82E-05
	P cell growth	1.48E-04
	P regulation of cell size	1.83E-04
	P growth	5.42E-04
	P unidimensional cell growth	1.57E-03
	P cellular polysaccharide metabolism	3.11E-03
	P auxin metabolism	4.77E-03
	P multidimensional cell growth	5.09E-03
	P glucan metabolism	5.51E-03
	P aging	1.31E-02
	P nucleotide-sugar metabolism	1.66E-02
	P regulation of cellular biosynthesis	2.20E-02
	F structural constituent of cytoskeleton	2.34E-02
	P circadian rhythm	2.80E-02
	P rhythmic process	2.80E-02
	P cell wall loosening (sensu Magnoliophyta)	2.96E-02
	P steroid biosynthesis	3.12E-02
	P regulation of biosynthesis	3.46E-02
Cluster 7	P cell wall modification (sensu Magnoliophyta)	3.46E-02
	C microtubule	3.63E-02
	F oxidoreductase activity, acting on sulfur group of donors	4.36E-02
	F structural constituent of ribosome	9.14E-12
	P ribosome biogenesis and assembly	3.26E-11
	P cytoplasm organization and biogenesis	3.26E-11
	C ribosome	1.86E-08

	P nucleosome assembly	1.70E-04
	P chromatin assembly	5.00E-04
	P chromatin assembly or disassembly	1.11E-03
	P mitochondrial transport	6.67E-03
	F serine carboxypeptidase activity	1.38E-02
	F carboxypeptidase activity	1.58E-02
	P indole derivative biosynthesis	2.75E-02
	P indole and derivative metabolism	2.93E-02
	P indole derivative metabolism	2.93E-02
	F heme binding	2.93E-02
	F chromatin binding	2.93E-02
	P regulation of biosynthesis	4.31E-02
	P cell proliferation	4.31E-02
	P glutamine family amino acid metabolism	4.74E-02
	C small ribosomal subunit	4.96E-02
	C plastid ribosome	5.42E-02
	P auxin metabolism	5.65E-02
Cluster 8	P nicotinamide metabolism	7.52E-04
	P pyridine nucleotide metabolism	1.04E-03
	P vitamin metabolism	1.21E-03
	P oxidoreduction coenzyme metabolism	1.71E-03
	P water-soluble vitamin metabolism	7.53E-03
	P pentose-phosphate shunt	8.19E-03
	P NADPH regeneration	8.81E-03
	P NADP metabolism	1.01E-02
	C cell fraction	1.15E-02
	C nucleoplasm part	1.50E-02
	P disaccharide metabolism	1.96E-02
	P protein amino acid dephosphorylation	2.15E-02
	F transaminase activity	2.44E-02
	C protein serine/threonine phosphatase complex	2.44E-02
	F transferase activity, transferring nitrogenous groups	2.44E-02
	P response to cadmium ion	2.44E-02
	P dephosphorylation	2.95E-02
	F peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	3.28E-02
	F cis-trans isomerase activity	3.39E-02
	P vitamin biosynthesis	3.39E-02
Cluster 9	P abscisic acid mediated signaling	3.74E-02
	F structural constituent of ribosome	5.36E-156
	F structural molecule activity	4.86E-139
	C ribosome	7.27E-120
	C ribonucleoprotein complex	1.49E-112
	C non-membrane-bound organelle	3.13E-91
	C intracellular non-membrane-bound organelle	3.13E-91
	P protein biosynthesis	6.57E-89
	P macromolecule biosynthesis	1.29E-81
	P cellular biosynthesis	3.25E-69
	C protein complex	1.85E-66
	P cytoplasm organization and biogenesis	6.80E-59
	P ribosome biogenesis and assembly	6.80E-59
	P organelle organization and biogenesis	1.40E-28
	C large ribosomal subunit	6.32E-18
	C small ribosomal subunit	4.50E-05
	F nucleobase, nucleoside, nucleotide kinase activity	1.82E-04
	P nucleoside metabolism	2.70E-02
	P axis specification	3.53E-02
	P structural organization	3.97E-02
Cluster 10	P meristem organization	3.97E-02
	P cell proliferation	5.16E-02
	F ATP-dependent helicase activity	9.78E-06
	C mitochondrial matrix	2.13E-05
	C mitochondrial lumen	2.13E-05
	C heterotrimeric G-protein complex	1.37E-04

	C extrinsic to plasma membrane	1.47E-04
	P glutamine family amino acid metabolism	2.03E-04
	C extrinsic to membrane	3.01E-04
	P female gametophyte development	5.75E-04
	P carotenoid biosynthesis	1.06E-02
	P tetraterpenoid biosynthesis	1.06E-02
	P cell wall modification during multidimensional cell growth (sensu Magnoliophyta)	1.49E-02
	P pentose-phosphate shunt	1.61E-02
	P cell wall modification during multidimensional cell growth	1.73E-02
	P NADPH regeneration	1.73E-02
	P tetraterpenoid metabolism	1.73E-02
	P carotenoid metabolism	1.73E-02
	P tRNA processing	1.98E-02
	F translation elongation factor activity	1.98E-02
	P NADP metabolism	1.98E-02
	F intramolecular oxidoreductase activity	1.98E-02
	P cell wall loosening (sensu Magnoliophyta)	2.67E-02
Cluster 11	P DNA replication	1.05E-12
	C chromosome	3.29E-12
	P DNA packaging	1.39E-10
	P establishment and/or maintenance of chromatin architecture	1.39E-10
	C chromatin	1.42E-10
	P chromatin assembly or disassembly	6.16E-10
	C nucleosome	8.54E-10
	C chromosomal part	9.45E-10
	P chromatin assembly	1.22E-09
	P nucleosome assembly	1.78E-09
	P DNA-dependent DNA replication	5.39E-09
	P protein complex assembly	1.06E-08
	F microtubule motor activity	1.45E-06
	P microtubule-based movement	4.88E-06
	F protein kinase regulator activity	5.88E-06
	F kinase regulator activity	6.88E-06
	P chloroplast organization and biogenesis	9.29E-06
	C microtubule associated complex	9.73E-06
	F protein homodimerization activity	3.39E-04
	F identical protein binding	6.46E-04
Cluster 12	P meiosis I	1.75E-02
	F oxidoreductase activity, acting on sulfur group of donors	1.10E-07
	C peroxisome	1.37E-06
	C microbody	1.37E-06
	P main pathways of carbohydrate metabolism	5.79E-06
	F oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	1.47E-05
	F ligase activity, forming carbon-sulfur bonds	9.14E-05
	F inorganic anion transporter activity	1.47E-03
	P fatty acid beta-oxidation	1.74E-03
	P cofactor catabolism	1.74E-03
	P fatty acid oxidation	2.17E-03
	P anion transport	2.19E-03
	P cellular respiration	3.80E-03
	F cellulose synthase activity	5.21E-03
	P inorganic anion transport	6.45E-03
	C organelle outer membrane	7.85E-03
	P oxidation-reduction coenzyme metabolism	8.36E-03
	P carotenoid biosynthesis	1.60E-02
	P tetraterpenoid biosynthesis	1.60E-02
Cluster 13	P tetraterpenoid metabolism	2.57E-02
	P carotenoid metabolism	2.57E-02
	F prenyltransferase activity	3.13E-02
	P amino acid derivative biosynthesis	1.43E-10
	P hexose metabolism	1.23E-09
	P phenylpropanoid biosynthesis	1.86E-09
	P carbohydrate catabolism	1.11E-07

	P cellular carbohydrate catabolism	1.11E-07
	C proteasome complex (sensu Eukaryota)	1.26E-07
	P glucose catabolism	7.25E-07
	P monosaccharide catabolism	8.15E-07
	P hexose catabolism	8.15E-07
	P alcohol catabolism	1.03E-06
	P glucose metabolism	1.03E-06
	P flavonoid biosynthesis	1.40E-06
	C proteasome core complex (sensu Eukaryota)	1.92E-06
	P flavonoid metabolism	2.96E-06
	P glycolysis	2.38E-05
	P metabolic compound salvage	6.71E-05
	P photorespiration	1.16E-04
	F intramolecular oxidoreductase activity	1.21E-03
	P biogenic amine biosynthesis	2.73E-03
	C proteasome regulatory particle (sensu Eukaryota)	8.51E-03
	P response to UV-B	8.51E-03
Cluster 14	C chloroplast inner membrane	7.02E-07
	C plastid inner membrane	9.90E-07
	C chloroplast membrane	1.08E-05
	P chlorophyll metabolism	1.81E-05
	C plastid membrane	2.16E-05
	C chloroplast envelope	1.13E-04
	P porphyrin metabolism	2.19E-04
	F oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	3.90E-04
	P protein amino acid dephosphorylation	6.29E-04
	P dephosphorylation	1.20E-03
	F transferase activity, transferring sulfur-containing groups	1.31E-03
	P vitamin biosynthesis	1.60E-03
	P jasmonic acid mediated signaling pathway	1.86E-03
	P starch metabolism	1.86E-03
	P response to high light intensity	4.62E-03
	P systemic acquired resistance	2.16E-02
	C membrane fraction	2.33E-02
	P cofactor catabolism	2.33E-02
	P tetraterpenoid metabolism	2.50E-02
	P carotenoid metabolism	2.50E-02
Cluster 15	F serine-type endopeptidase inhibitor activity	2.68E-02
	F carbon-oxygen lyase activity	1.39E-02
	P protein amino acid phosphorylation	1.42E-02
	P amino acid biosynthesis	1.79E-02
	P phosphorylation	1.99E-02
	C plasma membrane	2.03E-02
	P amine biosynthesis	2.22E-02
	P nitrogen compound biosynthesis	2.62E-02
	P metal ion transport	4.22E-02
	C mitochondrial part	4.29E-02
	C anchored to membrane	5.11E-02
	P carboxylic acid metabolism	5.59E-02
	P organic acid metabolism	5.62E-02
	P amino acid metabolism	7.71E-02
	P response to external stimulus	8.16E-02
	F lyase activity	8.98E-02
	P amine metabolism	1.01E-01
	P cation transport	1.01E-01
	F hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	1.06E-01
	P nitrogen compound metabolism	1.25E-01
Cluster 16	F carrier activity	1.31E-01
	P ion transport	1.33E-01
	C thylakoid membrane	2.80E-12
	C thylakoid membrane (sensu Viridiplantae)	1.35E-11
	P starch metabolism	9.93E-09
	C photosystem	2.85E-07

	C photosystem II	5.70E-06
	P glucan metabolism	4.42E-05
	C chloroplast inner membrane	4.88E-04
	C plastid inner membrane	6.06E-04
	P photosynthesis, light reaction	6.63E-04
	C chloroplast membrane	2.70E-03
	F inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity	2.81E-03
	C light-harvesting complex	2.81E-03
	P chlorophyll metabolism	6.39E-03
	P response to high light intensity	6.90E-03
	P carotenoid biosynthesis	2.04E-02
	P tetraterpenoid biosynthesis	2.04E-02
	P systemic acquired resistance	2.83E-02
	P pentose-phosphate shunt	3.04E-02
	P NADPH regeneration	3.27E-02
	P tetraterpenoid metabolism	3.27E-02
	P carotenoid metabolism	3.27E-02
Cluster 17	P microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	2.12E-03
	F O-acyltransferase activity	2.88E-03
	P chlorophyll metabolism	4.72E-03
	C microtubule	5.25E-03
	P M phase	6.99E-03
	P porphyrin biosynthesis	7.30E-03
	P cell wall biosynthesis (sensu Magnoliophyta)	7.62E-03
	P porphyrin metabolism	1.27E-02
	P RNA splicing	1.44E-02
	P cytoskeleton organization and biogenesis	1.59E-02
	P positive regulation of cellular physiological process	1.66E-02
	P cell wall biosynthesis	1.70E-02
	P positive regulation of cellular process	1.70E-02
	P pigment biosynthesis	1.79E-02
	P positive regulation of physiological process	2.29E-02
	P pigment metabolism	2.78E-02
	P microtubule-based process	3.12E-02
	P cell wall organization and biogenesis (sensu Magnoliophyta)	3.80E-02
Cluster 18	F disulfide oxidoreductase activity	4.32E-02
	P positive regulation of biological process	4.46E-02
	C microtubule cytoskeleton	4.94E-02
	C photosystem	1.84E-09
	C thylakoid membrane (sensu Viridiplantae)	7.54E-09
	C thylakoid membrane	1.11E-08
	P photosynthesis	7.49E-08
	P photosynthesis, light reaction	2.07E-03
	P circadian rhythm	2.42E-03
	P rhythmic process	2.42E-03
	C photosystem II	5.15E-03
	F di-, tri-valent inorganic cation transporter activity	1.02E-02
	P systemic acquired resistance	1.75E-02
	P fatty acid beta-oxidation	1.88E-02
	F oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, oxygen as acceptor	1.88E-02
	P NADPH regeneration	2.02E-02
	C light-harvesting complex	2.02E-02
	P fatty acid oxidation	2.16E-02
Cluster 19	P NADP metabolism	2.31E-02
	F oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	3.11E-02
	P nicotinamide metabolism	3.11E-02
	C unlocalized protein complex	3.28E-02
	P seed germination	3.46E-02
	F transition metal ion transporter activity	3.82E-02
	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	1.66E-05
	P response to heat	2.57E-05
	P abscisic acid mediated signaling	1.21E-04
	P stomatal movement	3.40E-04

	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions	5.12E-04
	P response to toxin	1.33E-03
	F amine transporter activity	1.36E-03
	F intramolecular oxidoreductase activity	2.20E-03
	P response to hydrogen peroxide	3.18E-03
	F amino acid transporter activity	3.18E-03
	P response to starvation	3.98E-03
	P response to nutrient levels	5.42E-03
	P inorganic anion transport	7.83E-03
	F organic acid transporter activity	8.52E-03
	P di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	8.52E-03
	F triacylglycerol lipase activity	8.52E-03
	P cellular response to starvation	1.63E-02
	P cellular response to nutrient levels	1.63E-02
	F cyclic nucleotide binding	1.79E-02
	F cation channel activity	2.14E-02
	F potassium ion transporter activity	6.10E-02
Cluster 20	P amine transport	3.14E-04
	P amino acid transport	3.14E-04
	P organic acid transport	4.79E-04
	P carboxylic acid transport	4.79E-04
	F amino acid transporter activity	6.80E-04
	F organic acid transporter activity	1.51E-03
	F carboxylic acid transporter activity	1.51E-03
	F amine transporter activity	1.62E-03
	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	1.62E-03
	F ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions	7.26E-03
	F ATP-dependent peptidase activity	8.63E-03
	P jasmonic acid mediated signaling pathway	9.29E-03
	P response to virus	1.21E-02
	P membrane organization and biogenesis	2.77E-02
	P glucan biosynthesis	2.77E-02
	P protein amino acid glycosylation	3.33E-02
	P glycoprotein biosynthesis	3.33E-02
	P biopolymer glycosylation	3.56E-02
	P vitamin biosynthesis	3.56E-02
	F oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	3.93E-02
	P glycoprotein metabolism	3.93E-02

Tabla S.3: Lista de genes de *Arabidopsis* regulados por el ácido jasmónico. Se señala la dirección del efecto: valores positivos promueven y valores negativos inhiben. (Goda et al., 2008).

Gen	Dirección de la señal
AT2G33060;AT2G33050	-0.864133868
AT2G26740;AT2G26750	1.097087607
AT2G39700	-1.288219318
AT2G39710	-1.206073426
AT2G30520	-1.023525089
AT2G30550	0.796385139
AT2G34930	2.260732765
AT2G34810	4.522375598
AT2G44380	-1.027552424
AT2G44460	2.093877938
AT2G44200	1.244560208
AT2G23760	1.511469953
AT2G23000;AT2G23010	1.81706243
AT2G23150	1.155556172
AT2G44080	-1.174029768
AT2G37710	-0.836686797
AT2G37540	-1.183278023
AT2G37620;AT3G53750	0.975036382

AT2G37750	0.862420106
AT2G23560	3.391544492
AT2G38240	3.158743198
AT2G41480	1.183014445
AT2G14800	-1.123533483
AT2G14750	1.806693311
AT2G34490	1.234209278
AT2G39340	0.939908969
AT2G39330	6.959910489
AT2G39420	2.037169294
AT2G39500	1.067845384
AT2G34600	3.012488281
AT2G45900	-0.958623672
AT2G05050;AT3G27140;AT4G08260;AT2G30020	1.12115695
AT2G22930	1.079721868
AT2G22860	3.025122757
AT2G29090	-3.519959786
AT2G29120	-0.925672761
AT2G28950	-0.751741816
AT2G02950	-1.336034139
AT2G25735	2.359477581
AT2G46270	0.783975086
AT2G47950	2.337381026
AT2G31180	2.041626032
AT2G31110	-0.778621219
AT2G22760	1.54440231
AT2G22770	1.088305683
AT2G38750	2.751244007
AT2G38760	2.982077967
AT2G41230	-1.523679847
AT2G32400	1.217069037
AT2G46650	1.725590191
AT2G29440	2.645639821
AT2G29290	-1.409533537
AT2G29450	2.130966553
AT2G27690	4.165630822
AT2G27830	1.162936973
AT2G06850	-0.892066054
AT2G28860;AT2G28850	1.292799801
AT2G38860	1.299243426
AT2G39030	5.699787781
AT2G12290;AT4G19700	-0.7997678
AT2G38050	1.227908455
AT2G19650	-1.00422814
AT2G15090	-1.353476149
AT2G01670	-0.797275575
AT2G35760	-1.019391879
AT2G48020	1.056792576
AT2G48010	0.787984803
AT2G32150	2.478885423
AT2G27500	0.775805328
AT2G25490	0.826504954
AT2G27310	1.016816975
AT2G28250	-0.849460819
AT2G06050	3.191384485
AT2G15760	1.769994701
AT2G46510	3.943509248
AT2G46520	1.465134275
AT2G18210	3.020236546
AT2G18290	-0.947225129
AT2G18300	-1.244339938
AT2G20340	1.89235478
AT2G28420	-3.055926276
AT2G43020	1.803239519
AT2G36630	-1.269979055
AT2G36690	-1.18559479

AT1G62500	0.894540827
AT1G62660	1.66237723
AT1G55450	-0.790170196
AT1G03820	-0.790658955
AT1G03940;AT1G03495	2.611434122
AT1G03870	-0.753918281
AT1G52000	5.229734065
AT1G52030;AT1G52040	5.424800293
AT1G61610	2.637592292
AT1G24530	-1.797397646
AT1G61120	6.461633434
AT1G23120	1.274330113
AT1G24280	-0.953500749
AT1G24100	1.302837226
AT2G17820	-0.755710856
AT1G09970	0.908725293
AT1G65490	-1.808117845
AT1G09090	1.42610741
AT1G08920	3.18819398
AT1G04680	-0.82840023
AT1G10070	1.849750468
AT1G30820	1.736913864
AT1G67110	-0.886454452
AT1G77270	-1.98042671
AT1G10140	0.854911771
AT1G43160	3.382485438
AT1G12020	0.797127889
AT1G70410	-0.778997629
AT1G61890	1.016405945
AT1G78680	0.826938906
AT1G60270	0.918427404
AT1G54740	-0.860082386
AT1G22650	-1.448481307
AT1G65310	-1.046290824
AT1G79310	1.298250886
AT2G31230	1.117182178
AT2G28470	-0.807630751
AT2G28510	0.810616798
AT2G03760	0.82400644
AT2G22330	2.772079831
AT2G42760	2.32307023
AT2G42690	-1.086705177
AT2G36220	-0.88140868
AT2G36380	1.747155264
AT2G36430	-1.052871707
AT2G22010	0.831996561
AT2G22010	0.939605494
AT2G21970	-0.75744726
AT2G04400	1.895976986
AT2G40435	2.220380581
AT2G40270	0.830393933
AT2G20610	0.939966087
AT2G24850	4.276287855
AT2G03980	2.859928103
AT2G22200	3.448225685
AT2G04080;AT2G04066	2.136937179
AT2G47180	2.81709165
AT1G30570	-1.126815062
AT1G05620	1.425759954
AT1G54050	1.428029265
AT1G54000;AT1G54010	0.762128132
AT1G54030	1.69890401
AT1G54020	5.579781524
AT1G03080	1.248337537
AT1G78490	1.862482812
AT1G78660	2.60098959

AT2G17500	1.853013793
AT1G24030	-2.95725925
AT1G24070	3.320325158
AT1G23850	2.181975681
AT1G64900	0.987143392
AT1G14700	-1.482962533
AT1G14740	-0.783403778
AT1G11720	0.962719613
AT1G13080	-1.523329477
AT1G10700	2.17404943
AT1G28660;AT1G28670	-1.31725993
AT1G28960	0.897312855
AT1G16370	1.790477201
AT1G75960	2.869702031
AT1G14130	2.572509079
AT1G14230;AT1G14250	1.98016032
AT1G14120	3.887256565
AT1G14150	-0.809730445
AT1G06620	2.705593016
AT1G06640	1.519617063
AT1G17190	2.438461788
AT1G49430	-0.968851473
AT1G49520	1.676954074
AT1G72920	1.453957958
AT1G72940	1.921755597
AT1G73080	0.799094468
AT1G64200	2.077037757
AT1G64160	5.154976645
AT1G53870;AT1G53890	2.078624971
AT1G53885	4.748300692
AT1G74760	-0.81214952
AT1G74950	3.314564879
AT1G52720	1.532041542
AT1G02850	1.039037909
AT1G59540	-1.223183476
AT1G35580	1.55654662
AT1G65860	1.494119922
AT1G65890	5.097667251
AT1G22550	1.4879203
AT1G80840	2.15769434
AT1G50560	1.171261561
AT1G50460	1.069427204
AT1G11580	1.352381084
AT1G15950	0.795237671
AT1G30530	1.306253271
AT1G30510	-1.012626787
AT1G15500;AT1G80300	0.806921855
AT1G15550	-0.964756114
AT1G76070	1.273808881
AT1G32640	3.097585549
AT1G18400	-1.028255579
AT1G18330	-0.807371509
AT1G18500	1.055537158
AT1G27730	2.271553563
AT1G49750	-0.896324061
AT1G01030	1.344863823
AT1G14280	-0.893136386
AT1G28370	0.808348356
AT1G28480	1.781641484
AT1G21100	2.001827568
AT1G07750	1.180210489
AT1G18710	4.511972982
AT1G44790	1.882466586
AT1G48440	0.961265486
AT1G48600	0.907536366
AT1G26770	1.354913209

AT1G20190	-3.068681225
AT1G19680	1.856960093
AT1G19570;AT1G19550	1.049007268
AT1G62990	1.137131997
AT1G63010	1.148122932
AT1G07390	-0.979214665
AT1G17380	4.357866636
AT1G17420	5.51529444
AT1G01260	0.76634164
AT1G12240	1.968029867
AT1G53580	1.16365459
AT1G02640	-1.244247061
AT1G29330	1.784537693
AT1G21910	-2.043909694
AT1G43650	1.018374932
AT1G49230	-1.218999646
AT1G49200	-1.947784623
AT1G32450	-1.262987326
AT1G32460	0.964811658
AT1G19300	1.266731199
AT2G47240	-1.094654756
AT2G43530	3.185515003
AT2G43520	2.416962317
AT2G43550	2.956507086
AT1G72450	2.843382434
AT1G72520	3.950418448
AT1G69870	0.75938757
AT1G69730	-1.073590527
AT1G69760	0.969228037
AT1G74100	1.573236866
AT1G69370	2.012515785
AT1G69360	1.810005448
AT1G74660	-1.480837473
AT1G74430	2.265194433
AT1G70700	4.810644469
AT1G67560	1.40892005
AT1G52890	4.143431795
AT1G66280;AT1G66270	1.688893075
AT1G66370	2.632544788
AT1G73260	1.62271185
AT1G78210	1.830994358
AT1G73830	-1.982072404
AT1G68840	-1.191008671
AT1G67910	-1.568927278
AT1G76590	1.853437403
AT1G76490	0.80642508
AT1G76640	6.106888774
AT1G76790	2.53908163
AT1G76650	3.188792937
AT1G76390	1.029256491
AT1G76380	1.015881375
AT1G52190	-3.425018146
AT1G72180	1.767283261
AT1G72230	-1.547585316
AT1G72260	2.385578187
AT1G29660	-0.929325739
AT1G29430;AT5G27780	-1.780950966
AT1G64405	-1.595315113
AT1G77450	1.181900143
AT1G77420	1.020697413
AT1G60960	-1.588146901
AT1G61065	1.523316158
AT1G55210	1.118022048
AT1G52380	1.232465939
AT1G52400	3.036193447
AT1G52410	5.200582391

AT1G28050	1.236178968
AT1G35260	1.460096444
AT1G21270	-1.122876213
AT1G20490	3.540477376
AT1G20510	2.415938231
AT1G17750	1.305322634
AT1G13280	1.478448573
AT3G16350	1.078452884
AT3G16410;AT3G16390;AT3G16400	1.042781166
AT3G16470	3.117637654
no_match	-1.175222549
AT3G05160;AT3G05165	1.685846614
AT3G01180	1.341437982
AT3G10260	1.742711722
AT3G02170	-0.761243109
AT3G10525	-0.996820509
AT3G09940	3.342389841
AT3G05660	-1.113743725
AT3G03190	1.500402155
AT3G10720	-1.222825253
AT3G08640	1.393732507
AT3G08030	-0.959058969
AT3G09830	0.85839054
AT3G02910	-0.974975761
AT3G02875	1.582619806
AT3G02885	-1.181626476
AT3G06500	2.524321973
AT3G06770	-1.04960781
AT3G06750	-0.827452465
AT3G02570	1.252715013
AT3G06070	-1.779898737
AT3G22400	0.764092963
AT3G22420	-1.683834853
AT3G16690	1.724315185
AT3G15500	1.368326107
AT3G14370	-1.499153565
AT3G22740	3.599593226
AT3G15790	1.847991359
AT3G14050	1.027323751
AT3G17860	2.161634277
AT3G21670	1.238787187
AT3G18200	-0.764251921
AT3G23550	3.706724552
AT3G14560	-0.793047055
AT3G21230	1.039378151
AT3G19370	-0.932813201
AT3G20820	-1.003614181
AT3G19930	-0.894560515
AT3G21750	0.930404525
AT3G17120	1.185459818
AT3G25180	1.170248994
AT3G15950	0.977261558
AT3G23030	0.955389716
AT3G29250	1.409890901
AT3G27420	0.832119547
AT3G12710	-1.230096512
AT3G26230	-1.728489922
no_match	1.444643428
AT3G25760;AT3G25770	2.145392764
AT3G25780	1.743521095
AT3G30775	1.990526823
AT3G16500	1.076983185
AT3G15210	1.122085756
AT3G19580	1.064102671
AT3G19200	0.77272441
AT3G14067	1.150463907

AT3G21870	-1.114177824
AT3G26330	1.976097037
AT3G22890	0.884397779
AT3G22160	1.607542282
AT3G13760	-1.928462552
AT3G13790	1.409896068
AT3G27170	1.167155418
AT2G34070	2.05984868
AT3G13620	1.515793141
AT3G28290;AT3G28300	2.8166322
AT3G28270	5.101571008
AT3G28220	5.997540812
AT3G28740	5.059578705
AT3G14770	-1.224089422
AT1G66180	-0.870061859
AT1G66100	4.025063647
AT1G31550	4.220812933
AT1G75230	0.790740376
AT1G75220	1.898221554
AT1G36280;AT4G18440	3.059750133
AT3G10930	1.700205213
AT3G06150	-0.766128644
AT1G66760	2.935179265
AT1G72030	-0.809204413
AT1G55020	1.644556679
AT1G69530	-1.110389806
AT1G69490	-3.031774177
AT3G12610	-1.029158961
AT3G11340	1.46899019
AT1G58200	1.157096763
AT1G50970	-2.057758278
AT1G51800	-0.754812367
AT1G51760;AT1G51780	3.666596654
AT1G30135	3.780973726
AT1G48750;AT1G48760	-1.043724544
AT1G07090	0.770106629
AT1G19150	-0.780805151
AT1G19180	3.5298547
AT1G58270	1.257480482
AT1G12620	-2.84570773
AT1G66970	-1.155320691
AT2G30360	1.192994905
AT2G40480	-1.127451982
AT2G33380	2.40773172
AT1G19860	-1.38199145
AT1G19670	5.289614301
AT1G18590	0.901815462
AT1G25500	1.927058024
AT3G29575	1.624757045
AT4G00050	-1.178805353
AT4G01080	4.773903288
AT5G59920;AT4G01350	0.881832205
AT4G01070	1.011948357
AT4G02360	5.065096854
AT4G02940	1.183238271
AT4G03060	0.886493471
AT4G04840	2.194857958
AT4G08150	-0.829443153
AT4G08170	1.763587244
AT4G08930	-1.076578579
AT4G08870;AT4G08900	2.8521404
AT4G09500	0.998006414
AT4G09510	1.27543033
AT4G10060	1.278029614
AT4G10390	2.082799118
AT4G10500	1.881038011

AT4G11190	1.441417463
AT4G11320;AT4G11310	1.497892832
AT4G11460	-0.865934054
AT4G11820	0.7992251
AT4G12790	0.967733455
AT4G13410	4.93221159
AT4G18140	1.578672629
AT4G18160	1.063249484
AT4G18610	-0.797920965
AT4G18970	-0.769052613
AT4G19230	0.925713716
AT4G19530	-1.013579711
AT4G21680	4.341657341
AT4G21830;AT4G21840	3.156659622
AT4G21850	1.907321883
AT4G21910;AT4G21900	2.293655486
AT4G22590	0.905781373
AT4G22610	3.15740166
AT4G22753	2.42601105
AT4G22820	0.763684417
AT4G23050	1.56135757
AT4G23100	1.029978722
AT4G23290	-1.002089415
AT4G23430;AT4G23420	1.293210893
AT4G23730	0.913167888
AT4G23600	2.247297289
AT4G24350	3.597091125
AT4G24240	-0.874040146
AT4G24370	-0.840957171
AT4G24340;AT4G24350	3.482043472
AT4G24780	-1.213716062
AT4G24830	1.724908396
AT4G25150	-1.621841503
AT4G25230	0.973867857
AT4G26080	1.028917897
AT4G27030	-1.101575927
AT5G54810;AT4G27070	1.550278093
AT4G27410	1.150130919
AT4G27560;AT4G27570	2.581185515
AT4G27860	1.787406728
AT4G28300	0.83448881
AT4G28240	-0.866406033
AT4G28910	1.488796701
AT4G29210	1.59563641
AT4G29190	-0.833892797
AT4G29690	2.821089778
AT4G29700	2.641014612
AT4G30110	-3.482576377
AT4G30210	0.777996366
AT4G30270	1.029719672
AT4G30190	-0.80411673
AT4G30460	1.103263702
AT4G30450	1.042561587
AT4G30530	1.503940481
AT4G30290	-2.003088113
AT4G31500	1.782841922
AT4G31800	1.599999005
AT4G31820	0.763735173
AT4G31910	-1.55794392
AT4G32460	-1.594303374
AT4G33070	-2.185314537
AT4G34200	1.201784961
AT4G34710	1.87492115
AT4G34770	-2.522389806
AT4G35060	1.516505302
AT4G35630	1.560296964

AT4G36110	1.743788845
AT4G36010	0.839507299
AT4G36220	0.756617211
AT4G37430;AT4G37432	1.079748837
AT4G37410	1.154359886
AT4G37370	-1.669658582
AT4G38470	1.277457134
AT4G38540	0.906801306
AT4G38860	-1.833577054
AT4G38840	-0.845360724
AT4G39030	2.319108518
AT4G39330	-0.977503465
AT4G39540	0.960527707
AT4G39660	1.198192807
AT4G39940	1.719255769
AT4G39950	2.299168753
AT4G39980	1.938645756
AT3G44320	1.925298255
AT3G44260	0.773492372
AT3G44720	1.438114444
AT3G44735	-0.960032237
AT3G44990	-1.016741721
AT3G45160	-0.842329381
AT3G45140	0.920394136
AT3G45260	-1.004417423
AT3G45430	1.299015274
AT3G45710	0.804282548
AT3G46670	1.002192817
AT3G47430	-1.379452599
AT3G48100	-0.867652233
AT3G47960	1.622530486
AT3G48350	1.963375307
AT3G48710	-1.524469795
AT3G49620	3.326332255
AT3G50270	1.272036793
AT3G50280	2.502221336
AT3G50560	-1.555852141
AT3G50950	-1.004220561
AT3G51090	2.290362494
AT3G51450	3.679587821
AT3G51660	1.448260323
AT3G51970	1.084180418
AT3G51920	-1.26261126
AT3G52720	-1.817423256
AT3G53670	1.387514196
AT3G53960	0.89159523
AT3G54640	1.979202727
AT3G54990	0.869856616
AT3G55310;AT3G55290	1.548515238
AT3G55640	0.869515978
AT3G55950	0.864828277
AT3G55970	5.131912108
AT3G56200	2.125806958
AT3G56260	1.567182126
AT3G57450	0.981747724
AT3G57520	2.540556746
AT3G57880	1.260196224
AT3G58710	0.752465627
AT3G59050	1.39609789
AT3G59340	2.120777065
AT3G59710	1.92742182
AT3G59760	1.713669289
AT3G59900	-2.191181089
AT3G60130	0.813739168
AT3G60490	0.958853276
AT3G61400	1.741293642

AT3G62010	1.434266997
AT3G62700	0.896034225
AT3G62860	0.912756157
AT5G01215;AT5G01210	0.857124201
AT5G01500	1.358188125
AT5G01840	1.081565019
AT5G01850	1.272224883
AT5G01740	-1.274055337
AT5G02170	1.943380256
AT5G02540	-1.370245819
AT5G02760	-2.251986477
AT5G02940	2.868356361
AT5G02890	-1.304237535
AT5G04590	1.14805438
AT5G05140	0.777016931
AT5G05600	4.216257062
AT5G05730	2.350753577
AT5G07010	3.461996381
AT5G06870	4.197346463
no_match	1.187343425
AT5G07460	2.227119577
AT5G07440	1.859769776
AT5G07820	-1.068205749
AT5G09980	3.087357806
AT5G10300	2.372188218
AT5G11420	-1.060306467
AT5G12050	-1.194514025
AT5G12940	-1.166836102
AT5G13330	2.509347886
AT5G13220	5.077239521
AT5G13800	1.77710871
AT5G14500	0.963360258
AT5G14700	1.372791487
AT5G15160	-0.798608568
AT5G16290	1.614014121
AT5G17860	1.401618748
AT5G17990	1.313230926
AT5G18670	-0.953023335
AT5G18860;AT5G18890	2.222573372
AT5G19100	1.670414454
AT5G19110	3.608942018
AT5G19200	-3.064469529
AT5G22250	1.537311197
AT5G22270	0.94848258
AT5G22460	-2.618934513
AT5G22570	0.841288916
AT5G22630	0.814182342
AT5G23730	-0.899395453
AT5G23580	1.220143354
AT5G23850	1.500088347
AT5G23830	1.772856383
AT5G23840	1.3421899
AT5G23820	1.57687826
AT5G23810	1.18627156
AT5G24030	-1.338508955
AT5G24140	2.706774524
AT5G24290	1.914355286
AT5G24410	1.178035172
AT5G24420	5.800435001
AT5G35940	3.919586799
AT5G37260	-0.755201253
AT5G37770	-0.955190937
AT5G38010;AT5G37950	0.999756436
AT5G38130	1.869551348
AT5G38980	-0.928685019
AT5G39050	1.033622741

AT5G39790	1.16187413
AT5G41050	-0.949771552
AT5G42580	2.83083625
AT5G42590	1.472870288
AT5G42600	2.183604385
AT5G42650	3.858648481
AT5G42800	2.050756624
AT5G42760	-0.83078685
AT5G43170	0.890177446
AT5G43520	-0.90566099
AT5G43580	2.51205907
AT5G43700	-0.752038875
AT5G43745	2.76688673
AT5G44050	3.801292569
AT5G44130	-1.193575301
AT5G44350	1.205491446
AT5G44680	-0.908038921
AT5G44720	1.634781944
AT5G47240	3.767524394
AT5G47220	0.994750636
AT5G47370	-0.815753732
AT5G47610	-1.113431897
AT5G47910	1.470199844
AT5G47980	1.077219974
AT5G47990	1.267219605
AT5G48000	0.958040225
AT5G48010	1.506649246
AT5G48110	0.86715746
AT5G48880	1.591439466
AT5G49280	1.386126417
AT5G49480	0.924901413
AT5G49740;AT5G49730	-1.622737568
AT5G50335	1.375505909
AT5G50670;AT5G50570	1.020976273
AT5G51070	1.154131829
AT5G52120	2.240777
AT5G52320	3.250715301
AT5G52570	1.575785188
no_match	-2.577806618
AT5G53050	1.054612279
AT5G53500	-1.283412617
no_match	1.371839182
AT5G54060	2.226182369
AT5G54170	0.866656438
AT5G54390	1.631325681
AT5G54960	0.796122524
AT5G55120	1.678385054
AT5G55620	-1.649557458
AT5G56760	1.163982331
AT5G57170	-1.017926131
AT5G57150	0.790303696
AT5G57240	-1.721724466
AT5G57760	-1.598540756
AT5G57780	-1.286244051
AT5G57785	-1.039405686
AT5G57800	1.045152665
AT1G25155;AT5G57890;AT1G25083;AT1G24909;AT1G24807;AT1G25220	1.435396417
AT5G58350	0.916133826
AT5G59480	1.10309847
AT5G59450	-0.863590282
AT5G59730	1.171025939
AT5G60300	2.250737221
AT5G60680	-1.009295413
AT5G60890	2.757798867
AT5G61160	1.424549186
AT5G62280	-2.300646271

AT5G63140	-0.822494232
AT5G63450	2.307925033
AT5G63790	1.434979215
AT5G63970	0.994343101
AT5G63980	1.258985077
AT5G64100	-1.246440204
AT5G64410	-0.82460239
AT5G64330	-1.227982303
AT5G64560	1.239922623
AT5G65020	1.135892369
AT5G64900	1.235397283
AT5G65280	2.555948728
AT5G65380	1.983239754
AT5G65870	0.779064285
AT5G66650	3.387167977
AT5G66690	-0.989284979
AT5G67080	4.280271542
AT5G67210	1.483555082
AT5G67160	1.341244492
AT5G67150	2.040646087
AT5G67300	1.323565528
AT5G67480	1.953226945
AT5G25280	-0.784605929
AT5G26260	1.004485867
AT5G26340	2.050377024
AT5G26600	1.04053717
AT5G27520	1.585278148
AT5G27380	1.639419254
AT5G33290	1.479791748
AT5G36220	3.144646426
AT1G31710	1.917534978
AT1G31710	2.117561091
AT5G14730	1.025167205
AT5G14760	-0.845482329
AT5G16190	2.194255765
AT5G17490	4.777533196
AT1G77370	0.766307916
AT3G43600	-0.781170728
AT3G44860;AT3G44870	5.03737346
AT4G36500	2.050369752
AT4G36540	-0.880991581
AT4G37080	-0.764950981
AT4G36790	0.796350108
AT4G37010	1.857686347
AT4G36990	1.143426051
AT5G20935	-0.798952423
AT5G20900	1.085020505
AT5G20050	-0.84138077
AT5G20550	1.716369199
AT5G19520	2.204531192
AT5G24770;AT5G24780	4.935278342
AT5G13550	1.991608467
AT1G73500	1.819917854
AT5G04120	3.57980099
AT5G04190	-1.750413499
AT5G04330	2.066358594
AT5G04340	0.82872281
AT4G15330	1.701888161
AT4G17470	6.948451596
AT4G17340	-0.8529515
AT4G17770	-0.931301848
AT4G15490	0.969088894
AT4G15210	2.284626712
AT4G16760	1.326003768
AT4G17500	2.200512743
AT4G15440	4.177694026

AT4G14680	2.167161163
AT4G15340	2.193330649
AT4G25620	1.14648395
AT1G44350	3.423192898
AT1G67750	-1.574915271
AT5G12340	2.558870993
AT2G47600	0.984183332
AT2G41510	-2.330343471
AT2G39770	1.466494388
AT2G23200	-1.516203569
AT2G23170	1.401491096
AT2G26530	2.581845687
AT2G43140	-1.584519166
AT1G15640	-1.790979583

Tabla S.4: Genes de *Arabidopsis* involucrados en la señalización del ácido jasmónico según ATCOECIS.

Gen	Descripción
AT2G43790	ATMPK6 (MAP KINASE 6)
AT5G47220	ATERF-2/ATERF2/ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2)
AT3G15210	ATERF-4/ATERF4/ERF4/RAP2.5 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 4)
AT2G46370	JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1)
AT3G15500	ATNAC3 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 55)
AT3G23240	ATERF1/ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)
AT1G32640	ATMYC2 (JASMONATE INSENSITIVE 1)
AT2G39940	COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1)
AT4G11260	SGT1B
AT2G02990	RNS1 (RIBONUCLEASE 1)
AT3G17860	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G48500.1)
AT1G28480	glutaredoxin family protein "Identical to Glutaredoxin-C9 (AtGrxC9) (GRXC9)
AT3G11820	SYP121 (syntaxin 121)
AT5G64930	CPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5)
AT1G19640	JMT (JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE)
AT5G11270	OCP3 (OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3)
AT4G34460	AGB1 (GTP BINDING PROTEIN BETA 1)
AT1G72260	THI2.1 (THIONIN 2.1)
AT5G40440	ATMKK3 (MITOGEN-ACTIVATED KINASE KINASE 3)
AT3G56400	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70)
AT4G01370	ATMPK4 (MAP KINASE 4)
AT5G44030	jasmonic acid mediated signaling pathway
AT4G18780	jasmonic acid mediated signaling pathway
AT2G44050	"COS1 (COI1 SUPPRESSOR1)
AT4G02570	ATCUL1 (CULLIN 1)
AT1G32230	RCD1 (RADICAL-INDUCED CELL DEATH1)
AT3G52400	SYP122 (syntaxin 122)